

1. Einleitung

1.1 Myokarditis und dilatative Kardiomyopathie

Die World Health Organisation (WHO) und die International Society and Federation of Cardiology (ISFC) definierten 1995 die Myokarditis als „eine entzündliche Erkrankung des Myokards [...] diagnostiziert durch standardisierte histologische, immunologische und immunhistologische Kriterien“ [1]. Man unterscheidet infektiöse (Viren, Bakterien, Protozoen, Pilze) und nichtinfektiöse Myokarditiden (toxisch, idiopathisch) sowie akute und chronische Verlaufsformen.

In der Aufklärung pathogenetischer Mechanismen der Myokarditis haben sich in den letzten Jahrzehnten zahlreiche Fortschritte ergeben. Gründe hierfür sind die Einführung der endomyokardialen Biopsie zur in-vivo-Diagnostik [2], die Standardisierung der histologischen Diagnostik durch die Dallas-Kriterien [3,4], sowie das bessere Verständnis der immunologischen Mechanismen im Menschen [5] und der kardiotropen Viren durch Studien der Myokarditis im Mausmodell [6]. Nicht zuletzt hat die mögliche Verbindung zwischen Myokarditis und dilatativer Kardiomyopathie (DCM) [7,8,9] die Forschungsbemühungen gesteigert.

Die inflammatorische Kardiomyopathie wird definiert als eine Myokarditis, die im Verlauf zu einer kardialen Dysfunktion mit Dilatation der Herzhöhlen führt. Es werden drei Formen der inflammatorischen Kardiomyopathie unterschieden: idiopathisch, autoimmun und infektiös. Prinzipiell kommen zahlreiche infektiöse Agenzien als Auslöser einer Myokarditis in Betracht, doch sind Viren, insbesondere Coxsackieviren der Gruppe B, am häufigsten mit dieser Erkrankung assoziiert [10,11].

Klinisch verlaufen virale Myokarditiden meist inapparent. Symptomatische Formen reichen von grippeartigen Krankheitsbildern mit Lymphadenitis und Myalgien bis zum plötzlichen Herztod bei fulminanter Myokarditis oder ventrikulärer Arrhythmie. Bei einem Teil der Patienten kommt es langfristig zu einer erheblichen kardialen Dysfunktion mit Ausweitung der Herzhöhlen, die in Unkenntnis der Pathogenese häufig als idiopathische dilatative Kardiomyopathie fehldiagnostiziert wird [12,13]. Durch die Einführung molekularbiologischer Methoden (Polymerase Kettenreaktion (PCR), in-situ Hybridisierung) bei der Untersuchung endomyokardialer Biopsien [14] lässt sich in etwa einem Fünftel der Fälle enterovirales Genom im Myokard nachweisen [8].

1.2 Coxsackieviren [15]

Coxsackieviren gehören zur Familie der Picornaviren, genauer zum Genus der Enteroviren. Es handelt sich dabei um kleine, unbehüllte RNA-Viren mit einem Durchmesser von etwa 30 nm. Das Virion besteht aus einer zentralen (+)-Strang-RNA und einem außen liegenden ikosaederförmigen Capsid. Die (+)-Strang-RNA enthält etwa 7500 bp und besteht aus einer nicht-kodierenden Region am 5'-Ende und einer kodierenden Region am 3'-Ende, gefolgt von einer Poly-Adenosin-Sequenz. Am 5'-Ende der (+)- und (-)- RNA-Stränge sitzt jeweils ein kovalent gebundenes VPg-Protein, das als Primer für die Replikation erforderlich ist [16,17]. Das Viruskapsid besteht aus den vier Proteinen VP1 – VP4, wobei VP1 – VP3 die Ausbildung der Virusgestalt bestimmen und VP4 zur Stabilisation des Kapsids und der Interaktion zwischen Kapsid und Virusgenom benötigt wird [16,17]. Dem VP1-Protein wird eine wichtige Rolle bei der Ankopplung des Virus an die Zielzelle zugeschrieben. Diese erfolgt über den Coxsackie-Adenoviral-Rezeptor (CAR) [18,19] und führt zur Endozytose des Virus. Nach dem Uncoating und der Überführung der (+)-Strang-RNA kommt es zur Virusproteinsynthese und RNA-Replikation [16].

Coxsackieviren werden aufgrund von Untersuchungen in der Babymaus und dem beobachteten unterschiedlichen Organotropismus sowie der damit verbundenen Gewebeschädigung in die Untergruppen A und B unterteilt [20]. Viren der Untergruppe A mit 24 Serotypen erzeugen bei der Babymaus eine diffuse Myositis [21]. Die Untergruppe B mit 6 Typen erzeugt dagegen eine herdförmige Myositis, daneben auch noch zahlreiche andere Organläsionen, wie Encephalomyelitis, Pankreatitis, Endokarditis und Myokarditis [21]. Der einzige natürliche Wirt ist der Mensch [21]. Experimentell infizierbar sind aber auch Mäuse [22,23], Hamster [24], Ratten [25] und Schimpansen [15].

Die Infektion beim Menschen erfolgt entweder fäkal-oral oder als Tröpfcheninfektion [21]. Die Viren vermehren sich im lymphatischen Gewebe des Pharynx und im gesamten Intestinaltrakt, mit nachfolgender Virämie und Virusvermehrung in den Zielorganen (Muskeln, Meningen, Pankreas, Herz, Haut). Dabei sind die hervorgerufenen Krankheitsbilder sehr vielfältig und reichen vom leichten fieberhaften Infekt bis zu schweren zentralnervösen und kardialen Erkrankungen [21].

1.3 Vorstellungen zur Pathogenese der Myokarditis

Bei der experimentellen viralen Myokarditis in Mäusen lassen sich prinzipiell zwei verschiedene pathogenetische Mechanismen, nämlich die direkte virale und die immunvermittelte Schädigung des Herzgewebes, unterscheiden. Dabei bewirken Viren hauptsächlich die Schädigungen in den ersten Tagen post infectionem (p.i.), während später die Auswirkungen der Immunaktivierung überwiegen [26].

1.3.1 Verlauf der experimentellen viralen Myokarditis im Mausmodell

Es lassen sich drei Phasen im Verlauf der viralen Myokarditis bei der Maus unterscheiden [26] (siehe Abb. 1.1), wobei die akute und subakute Phase auch unter dem Begriff „Akutphase“ zusammengefasst werden:

- akute Phase der viralen Myokarditis (0. – 3. Tag p.i.)
- subakute Phase der viralen Myokarditis (4. – 14. Tag p.i.)
- chronische Phase der viralen Myokarditis (ab 15. Tag p.i.)

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

Nach intraperitonealer Infektion mit kardiotropen Viren wie CVB3 lassen sich innerhalb der ersten drei Tage erste histologische Veränderungen in Gestalt einzelner nekrotischer Kardiomyozyten in Abwesenheit eines zellulären Infiltrates finden [11,27,28]. Ab dem 3. Tag p.i. sind im Myokardgewebe bereits erhöhte mRNA-Konzentrationen von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-1 β , TNF- α und IFN- γ [29,30] sowie vereinzelt zelluläre Infiltrationen aus Natürlichen Killer-Zellen (NK-Zellen) und Makrophagen nachweisbar [31,32].

Myokardschädigungen in der Frühphase der viralen Myokarditis können demnach nur direkt viral bedingt sein [33-35]. Ebenso wie für viele andere Virusgruppen konnte nachgewiesen werden, dass Enteroviren im Rahmen ihres intrazellulären Replikationszyklus infizierte Zellen abtöten [15]. Daneben wurde auch eine direkte Pathogenität für enterovirales Protein festgestellt [36]. Weiter kam es bei in-vitro Untersuchungen an isolierten nicht-infizierten Herzmuskelzellen durch CVB3-Infektion zum Zelluntergang [37].

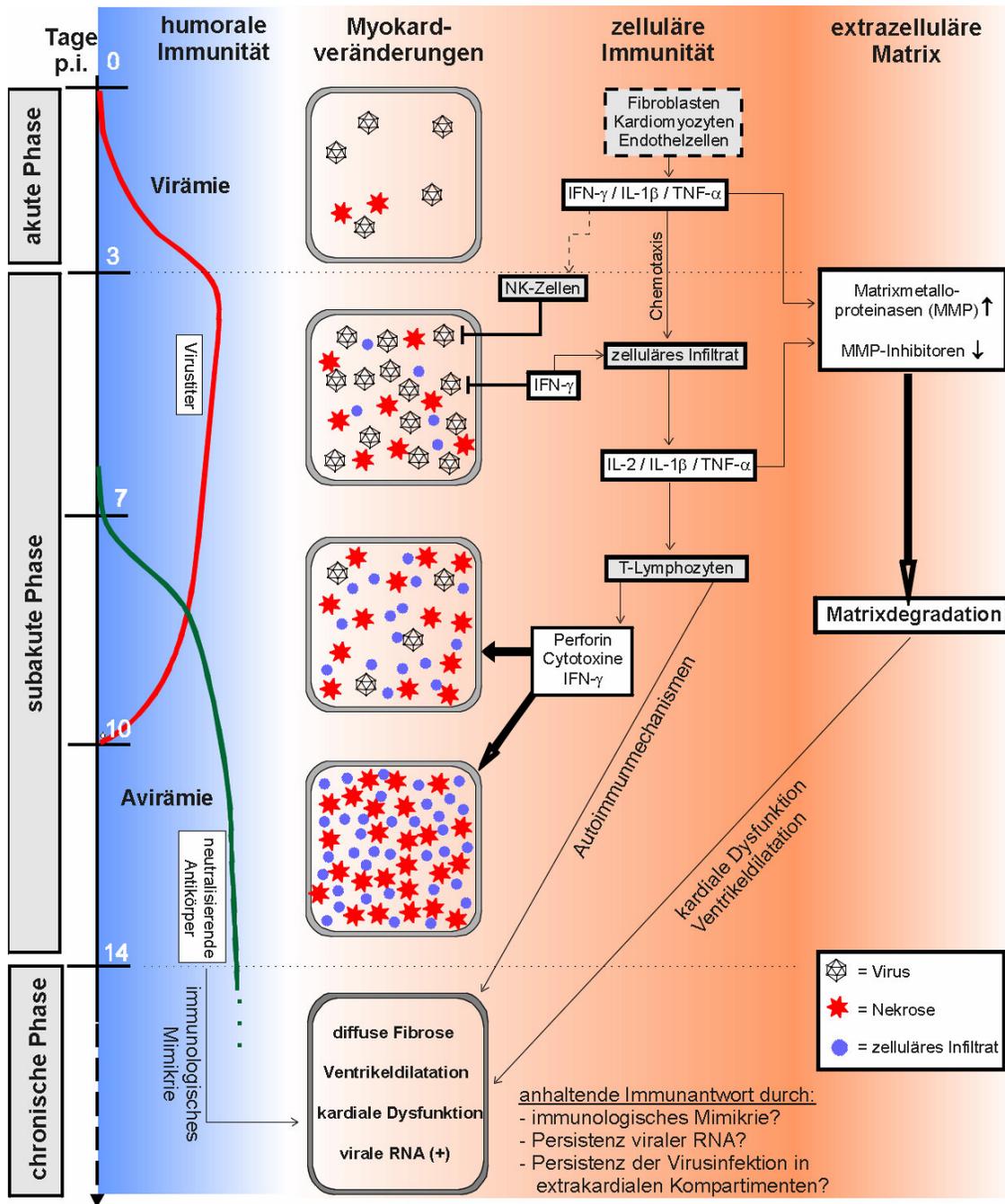


Abb. 1.1: Verlauf der experimentellen viralen Myokarditis im Mausmodell
(in Anlehnung an [26]).

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

In der subakuten Phase stellt sich zunehmend ein entzündliches Infiltrat ein. Dieses setzt sich vornehmlich aus Lymphozyten, Makrophagen und Fibroblasten zusammen [26]. Die Lymphozytenpopulation besteht vor allem aus Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen), CD8⁺- und CD4⁺-T-Zellen [26]. Dabei überwiegen zu Beginn die NK-Zellen, während später vor allem die Zahl der CD8⁺-Zellen ansteigt. B-Lymphozyten und Plasmazellen sind nur vereinzelt im Myokard nachweisbar [26].

Aktivierete NK-Zellen werden als protektiv gegen die virale Infektion angesehen, da sie die Virusreplikation limitieren [38,39]. Zwar können sie durch die Freisetzung von Perforin Kardiomyozyten abtöten [40], jedoch bezieht sich die Schädigung nur auf virusinfizierte Zellen [39]. Die Bedeutsamkeit der frühen Viruselimination durch NK-Zellen wird durch die deutlich schwerere Myokarditis bei NK-Zell-Defekt im Mausmodell belegt [39].

Art und Umfang der Zytokinproduktion scheinen eine entscheidende Rolle im Pathomechanismus der Myokarditis zu spielen. Zytokine kontrollieren die T-Zellantwort bei der Immunantwort und Autoimmunmechanismen und können die T-Helferzell-Population in Richtung einer Th₁- oder Th₂-Antwort verschieben [41,42] (siehe Kapitel 1.3.2).

Seko et al. [43] untersuchten die mRNA-Expression verschiedener Zytokine zu unterschiedlichen Zeitpunkten in den ersten 14 Tagen nach CVB3-Infektion in C3H/He-Mäusen. Sie fanden eine erhöhte Expression von IL-1 β , IL-6, TNF- α und IFN- γ bis zum 7. Tag p.i. und schlossen daraus, dass diese proinflammatorischen Zytokine vorwiegend von herzständigen Fibroblasten, Kardiomyozyten und Endothelzellen produziert wurden und ihre Expression durch die virale Infektion zumindest teilweise induziert war. Eine Vermehrung von inflammatorischen Zytokinen wie IL-2, IL-4 und IL-10 wurde nur nach dem 5. oder 7. Tag p.i. gefunden. Die Expressionen von TNF- α , IFN- γ und IL-1 β waren ebenso ab dem 5. Tag p.i. erhöht, jedoch noch am 14. Tag p.i. erhöht nachweisbar. Zum Zeitpunkt des Auftretens dieser Zytokine beginnt die massive zelluläre Infiltration des Myokards [28,44]. Nicht sicher geklärt ist, ob die Expressionssteigerung dieser Zytokine in der akuten und subakuten Phase durch eine viralbedingte Stimulation oder durch die erhöhte Zellzahl im Myokard bedingt ist [43,45]. In einer Studie bei Infektion mit dem Enzephalomyokarditisvirus (EMCV) wurde für TNF- α , IFN- γ , IL-2 und IL-1 β eine erhöhte Expression bis zum 80. Tag p.i. gefunden [29].

Mehrere Studien zeigten, dass IL-1 und IL-2 den Verlauf der Krankheit aggravieren können [46], während die Rezeptorblockade von IL-1 und IL-2 die Ausprägung einer Myokarditis und die Mortalität vermindert [47,48].

Das antiinflammatorische Zytokin TGF- β ist ein wichtiger Stimulator der Fibroblastenproduktion und seine Hemmung reduziert deutlich den Grad der kardialen Fibrose [49]. Daneben hat TGF- β auch Einfluss auf die Differenzierung und Proliferation von T-Lymphozyten [50]. IL-6 ist ein bedeutsamer Mediator der Makrophagenaktivierung [51], der Induktion von Akute-Phase-Proteinen [52] und der B-Zell-Differenzierung [52]. Die Gabe von IL-6 in der Frühphase einer Myokarditis reduzierte deutlich die zelluläre Infiltration, die Gewebsnekrose, den viralen Titer und die Mortalität [53], wohingegen die kontinuierliche Gabe zu stärkeren Gewebsschäden und einer erhöhten Virämie führte [54].

Zytokine haben auch Effekte auf die Hämodynamik. IL-1 β , IL-6 und TNF- α stimulieren die NOS (Stickstoffmonoxid-Synthetase) und wirken so indirekt negativ-inotrop [55]. TGF- β erhöht den Blutdruck durch einen stimulierenden Effekt auf das vasokonstriktorische Endothelin [56,57]. Eine Blockade von TGF- β verbessert die diastolische Funktion [49].

Der Einfluss einzelner Zytokine auf die Pathogenese ist jedoch schwer zu beurteilen, da Zytokine multiple biologische Effekte haben und die Expression anderer Zytokine beeinflussen können [26]. Nicht zuletzt spielen die Zytokine eine entscheidende Rolle bei der Expression von Matrixmetalloproteinasen und deren spezifischen Inhibitoren, womit sie indirekt die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix kontrollieren (siehe Kapitel 1.4).

Die Viruskonzentration im Myokard steigt in der akuten Phase an und erreicht zum 4. Tag p.i. maximale Werte [58]. Zu diesem Zeitpunkt sind noch keine neutralisierenden Antikörper nachweisbar [58]. Die Antikörpertiter steigen zum 8. – 10. Tag rapide an und sind um den 14. Tag p.i. maximal. Der ansteigende Antikörpertiter korreliert mit der Elimination des Virus aus dem Herzwesche, wo ab dem 10. Tag keine Viren mehr nachweisbar sind [11,58,59]. Die Viruselimination geschieht nicht nur durch neutralisierende Antikörper, sondern auch durch infiltrierende mononukleäre Zellen [11,59]. Demzufolge ist etwa ab dem 10. Tag p.i. keine wesentliche direkt viralbedingte Schädigung des Myokards mehr anzunehmen, da NK-Zellen, neutralisierende Antikörper und infiltrierende Makrophagen zur Beseitigung kardiotroper Viren geführt haben [26]. Mit dem Einsetzen des T-Zell-Infiltrates zwischen dem 7. und 14. Tag p.i. kommt es jedoch zu den schwersten pathologischen Veränderungen im Myokard [60].

Verschiedene Studien zeigten, dass für die Ausbildung einer Myokarditis eine T-Zell-Antwort essentiell ist. So bildet sich die Krankheit in experimentell bzw. genetisch T-Lymphozyten-defizienten Mäusen nicht vollständig aus [61-64]. Die Nekrosereduktion scheint dabei

virusunabhängig zu sein, da sich die Virustiter im Vergleich zu immunkompetenten Tieren nicht unterscheiden [62,64]. So zeigten sich in T-Lymphozyten-defizienten BALB/c-Mäusen nach Infektion mit EMCV im Vergleich zum Wildtyp geringere pathologische Veränderungen, keine Dilatation der Ventrikel und eine deutlich erhöhte Überlebensrate bei Abwesenheit einer effektiven Immunantwort [62]. Auch hier wird der Virustiter durch T-Lymphozyten-Suppression nicht beeinflusst. Daher scheint die Viruselimination vorwiegend durch die humorale und kaum durch die zelluläre Immunität zu geschehen. Letztere scheint dagegen nach Entfernung der Viren aus dem Myokardgewebe pathogenetisch ursächlich an der fortschreitenden Myokardschädigung zu sein. T-Lymphozyten erkennen virale Antigene auf infizierten Myozyten, die ihnen an MHC-Klasse-I-Proteinen präsentiert werden, woraufhin zytotoxische T-Zellen diese Zellen lysieren können. Dies geschieht entweder über die Ausschüttung von Lymphokinen [65,66] oder über die Aktivierung anderer Entzündungszellen wie Makrophagen. Sie sind damit auch mitverantwortlich für die Aufrechterhaltung des zellulären Infiltrates [66,67].

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

In der chronischen Phase der Myokarditis kommt es 90 Tage nach Infektion in DBA/2-Mäusen zur Erhöhung des Herzgewichts, Vergrößerung und Dilatation des linken Ventrikels und Auftreten von fibrotischen Veränderungen, während kaum entzündliches Infiltrat mehr nachweisbar ist. Diese Veränderungen sollen mit IL-1 assoziiert sein [30] und ähneln den kardialen Läsionen in Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie [68].

Virale RNA lässt sich mittels in situ Hybridisierung in EMCV-infizierten Mäusen noch drei Wochen p.i. im Myokard und vier Wochen im Gehirn nachweisen [69]. Einer Hypothese zur Folge [70] sollen in der chronischen Phase T-Lymphozyten aufgrund der persistierenden viralen RNA als fortbestehender antigener Reiz ins Gewebe infiltrieren. Unterstützt wird diese Theorie durch die Beobachtung, dass drei verschiedene immunkompetente Mausstämme, in denen enterovirale RNA persistiert, eine chronische Myokarditis entwickeln, während sich bei DBA/1-Mäusen, bei denen die virale RNA in der Frühphase eliminiert wird, keine Chronifizierung zeigt [70]. Die chronische Myokarditis ist jedoch nicht obligat mit der Viruspersistenz verknüpft. Schließlich führt die Depletion von T-Lymphozyten trotz fehlender Viruselimination zu einer effektiven Verhinderung sowohl der kardialen

Entzündung als auch der Herzmuskelnekrose [63]. Das Ausmaß der Erkrankung scheint daher vielmehr von der Art der Immunantwort auf das Virus abzuhängen [71].

In verschiedenen Mausmodellen lässt sich eine der viralen Myokarditis ähnliche Autoimmunmyokarditis auslösen. Dabei reagieren autoreaktive T-Lymphozyten mit normalen antigenen Strukturen auch nichtinfizierter Kardiomyozyten [66,72-77], welche im Sinne „molekularen Mimikries“ zur Autoimmunität führen können. Der Begriff „molekulares Mimikrie“ wurde zuerst von Damian [78] zur Charakterisierung für die Induktion einer Immunantwort durch homologe antigene Determinanten, die auf einem wirtseigenen Protein und einem infektiösen Agens vorliegen, geprägt. Die Induktion organspezifischer Antikörper gegen kardiales Myosin [75-77], den β -Adrenorezeptor [79], den ADP/ATP-Carrier [80,81], den Ca^{2+} -Kanal [80,82], das Connexon der Gap Junctions, den Muscarinrezeptor sowie gegen Strukturen des myokardialen Bindegewebes wurden bisher identifiziert [83,84]. Die klinische Signifikanz der meisten dieser Zielproteine ist aufgrund ihrer intrazellulären Lokalisation unklar [85]. Als wichtigstes Autoantigen wird kardiales Myosin angesehen [75-77]. Nach experimenteller CVB3-Myokarditis werden in empfänglichen Mausstämmen deutlich höhere Titer von Antikörpern gegen kardiales Myosin produziert als in virus-resistenten Mausstämmen [71]. De facto gleicht die myosininduzierte Myokarditis histologisch der viralen Myokarditis [75,76]. Andererseits zeigt ein Vergleich der Gensequenz von kardialem Myosin, insbesondere die in A/J-Mäusen sehr myokarditogene *Sequenz 325-327 heavy chain α* , keine Homologien mit derjenigen des CVB3-Genoms [86,87]. Ebenso besteht keine Kreuzreaktivität zwischen Myosin und CVB3 unter Verwendung von B- und T-Zell-Assays [27,86]. Die autoimmune Reaktion könnte daher im Wesentlichen in einer verstärkten Freisetzung von kardialem Myosin und intrazellulären Autoantigenen bestehen, welche ähnlich einem Adjuvans eine unspezifische Immunreaktion stimulieren. Dabei könnten auch Makrophagen beteiligt sein, die nach Abbau lysierter Kardiomyozyten die Bestandteile an der Oberfläche präsentieren und auf diesem Wege die Immunreaktion promoten. Nach dieser Theorie könnten sowohl die zelluläre als auch die humorale Immunität an dem Fortschreiten kardialer Läsionen in der chronischen Phase beteiligt sein. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass sich bei Mausstämmen, die normalerweise eine akute Myokarditis ausheilen, durch Gabe von IL-1 und TNF- α eine chronische Myokarditis induzieren lässt [88].

Eine weitere Möglichkeit der Myokardschädigung könnte durch Persistieren der Virusinfektion in Milz, Lymphknoten, Leber und Pankreas als extrakardialen Kompartimenten bestehen [71,89,90]. Eine kontinuierliche oder periodische Freisetzung chronisch infizierter

Immunzellen könnte demnach zu einer persistierenden viralen Infektion des Myokards beitragen [91].

Die Entwicklung einer Myokarditis zur dilatativen Kardiomyopathie ist im Detail weiterhin unklar. Persistieren viraler RNA, immunologisches Mimikrie und/oder eine persistierende extrakardiale Virusinfektion sind vermutlich daran beteiligt [26,71].

1.3.2 Vorstellungen zur Rolle der Th₁- und Th₂-Immunantwort bei der akuten CVB3-induzierten Myokarditis

Im Verlauf einer Myokarditis kommt es nach dem anfänglichen Einwandern von NK-Zellen und Makrophagen zur Differenzierung von T-Lymphozyten.

T-Lymphozyten lassen sich aufgrund der Expression unterschiedlicher T-Zell-Rezeptoren und Oberflächenmarker sowie verschiedener MHC-Restriktion weiter unterteilen. CD4⁺-T-Lymphozyten spielen dabei eine besondere Rolle in der Koordinierung der Immunantwort.

Die chronische Stimulation von kürzlich aktivierten, unbeteiligten Vorläufer-CD4⁺-T-Zellen (naive Th₀-Zellen) durch antigenpräsentierende Zellen (B-Lymphozyten, Makrophagen, dendritische Zellen) [92] verursacht ein Ausreifen dieser Lymphozyten zu Th₁-Zellen oder Th₂-Zellen, welche ein eingeschränkteres Zytokinmuster in einer höheren Konzentration sezernieren können.

1.3.2.1 Th₁- / Th₂-Zellen

Mosmann & Coffman [93] identifizierten 1986 zwei verschiedene T-Helferzell-Populationen, die sich durch die Zytokinproduktion von IFN- γ bzw. IL-4 charakterisieren lassen und zu unterschiedlichen Immunantworten führen. Das jeweils produzierte Zytokinmuster ist auch das einzige Unterscheidungsmerkmal dieser beiden T-Zell-Populationen, da noch keine spezifischen Zelloberflächenmarker etabliert sind [94].

Welche Th-Antwort ausgelöst wird hängt von verschiedenen Faktoren zu Beginn der Immunantwort ab. Dazu gehören die Art und Dosis des Antigens [95], der Antigeneintrittsort [86], die primär produzierten Zytokine [94], die Kostimulation der T-Zellen [97], die Art der antigenpräsentierenden Zellen und die genetische Prädisposition des Wirtes [98,99].

Auf Antigenkontakt sezernieren naive Th₀-Lymphozyten geringe Mengen IL-2, IL-4 und IFN- γ [100]. Das Einwirken von IFN- γ und IL-12 auf die Th₀-Zellpopulation führt zum Ausreifen von Th₁-Zellen, die viel IFN- γ , IL-2, IL-12, TGF- β und TNF- β produzieren, aber nur wenig IL-4 und IL-5 [98,101]. Die Inkubation von naiven Th₀-Zellen mit IL-4 führt indessen zur Entwicklung von Th₂-Zellen [102], die mehr IL-4, IL-5, IL-6 und IL-10 und wenig bis kein IL-2 und IL-12 sezernieren [101,103,104]. Bei Kostimulation mit IL-4 und IL-12 ist die Wirkung des IL-4 dominierend [105,106]. Analog ist es bei IL-6 aus Th₂-Zellen, das in hohen Konzentrationen trotz Präsenz von IL-12 eine Th₁-Ausreifung aus naiven Th₀-Zellen verhindert [107]. Die von den einzelnen Th-Subpopulationen gebildeten Zytokine stimulieren nicht nur die eigene Entwicklung, sondern hemmen auch den anderen Subtyp. So dient von Th₂-Zellen sezerniertes IL-4 der positiven Rückkopplung und IL-4 und IL-10 der Inhibition der Th₁-Zellen; umgekehrt verhindert das Vorhandensein von IL-12 die Reifung von naiven T-Zellen zu Th₂-Lymphozyten [98,101,104]. Diese Wirkung auf Th₀-Zellen gilt jedoch nicht für bereits polarisierte Th₂-Zell-Klone, da diese durch IL-12 in vitro [105] und in vivo [108] eine gesteigerte IL-4-Produktion zeigen. Desweiteren wurde beschrieben, dass ausgereifte Th₂-Zell-Klone nach Stimulation mit IL-12 sogar IFN- γ bilden können, ohne die Synthese ihres typischen Th₂-Zytokinprofils zu unterlassen [109].

Eine generierte Helferzell-Subpopulation kann sich bedingt in den anderen Th-Zell-Phänotyp umwandeln (Th₁-/Th₂-Switch). In Versuchen zeigte sich, dass zum einen mit IL-4 stimulierte Th₁-Zellen sich in Th₂-Zellen und sich zum anderen Th₂-Zellen durch Inkubation mit IL-12 und IFN- γ in Th₁-Zellen umwandeln lassen [110]. Nach einer Langzeitstimulation ist der Th₁/Th₂-Switch jedoch nicht mehr möglich [111].

Th₁-Zellen werden klassischerweise mit der zellulären Immunantwort in Verbindung gebracht [112]. IFN- γ stimuliert die Produktion von komplementbindendem IgG und die Makrophagenaktivierung. Daneben fördern Th₁-Zytokine die Differenzierung von CD8⁺-Lymphozyten zu zytotoxischen T-Zellen und aktivieren neutrophile Granulozyten und NK-Zellen. Sie sorgen daher vor allem für die Elimination intrazellulärer Erreger wie Viren sowie einige Parasiten und Bakterien [113].

Th₂-Zellen vermitteln überwiegend die humorale Immunität [112]. Von ihnen synthetisierte Zytokine stimulieren die B-Zell-Proliferation und Differenzierung, fördern die Produktion von IgE und die Differenzierung von eosinophilen Granulozyten und inhibieren die Makrophagenaktivierung [112].

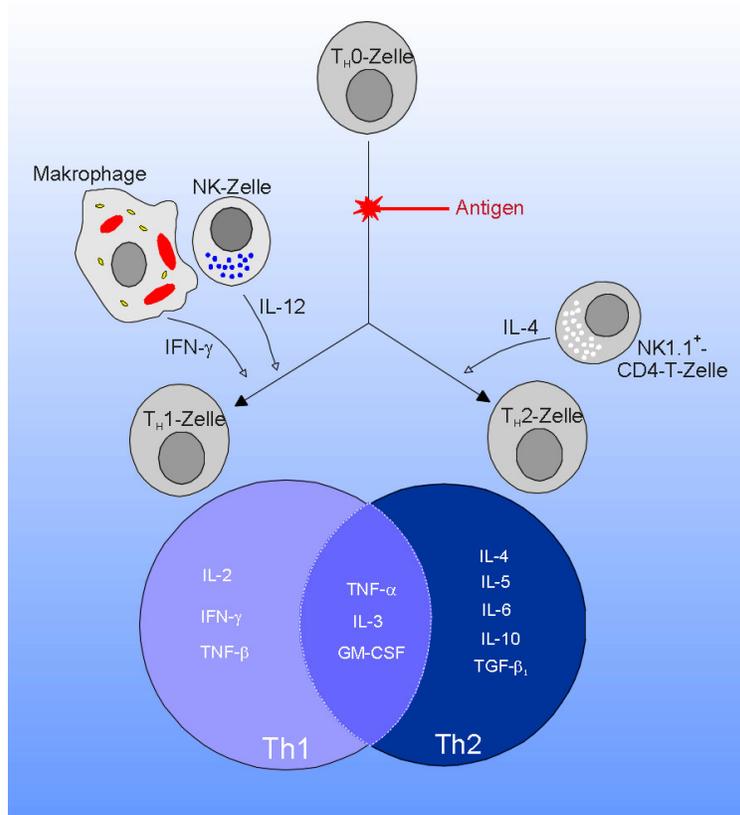


Abb. 1.2: Veränderung der Zytokinproduktion von Th-Zellen nach Antigenkontakt (in Anlehnung an [93]).

1.3.2.2 Rolle einer Th₁- und Th₂-Immunantwort bei der akuten Myokarditis

In verschiedenen Tiermodellen konnte das Überwiegen von Typ 1- oder Typ 2-Zytokinen eine Verschlechterung oder Verbesserung der Myokarditis bewirken. Seto et al. [43] konnten bei durch CVB3 verursachter experimenteller akuter Myokarditis in vivo zeigen, dass Th₁-abhängige Zytokine wie IL-2, IFN-γ und TNF-α stärker exprimiert werden als Th₂-abhängige Mediatoren wie IL-4, IL-5 und IL-10, so dass die Immunantwort in der frühen Phase der Infektion überwiegend vom Th₁-Typ ist. Daneben wurden in BALB/c- und B1.Tg.Eα-Mäusen geschlechtsspezifische Unterschiede beschrieben [114,115]. So bilden männliche Tiere vorwiegend eine Th₁-Antwort aus, während bei weiblichen Mäusen Th₂-Zellen dominieren. Dabei zeigen weibliche BALB/c-Mäuse deutlich reduzierte Myokardschädigungen gegenüber den männlichen Versuchstieren, so dass hier die Th₂-Antwort die Myokarditis zu bessern scheint [115]. Auch bei der Applikation von Antikörpern gegen die Korezeptoren der

Antigenpräsentation B7-1 und B7-2 bei chronischer Myokarditis in A/J-Mäusen [116] und murinen Kardiomyozytenkulturen [117] konnte eine Besserung bei Überwiegen von Th₂-Zellen festgestellt werden.

Dagegen zeigten Afanasyeva et al. [118] bei der Untersuchung der CVB3-Myokarditis in A/J- und BALB/c-Mäusen unter anti-IL-4-Behandlung eine deutliche Reduktion der Myokarditis, wonach die Schädigung eher Th₂-vermittelt war. Desweiteren wurde kürzlich in IL-12-defizienten BALB/c-Mäusen gezeigt, dass die Zytokine der Th₁-Zellen nicht alle konkordant wirken. So verschärft IL-12 die myokarditischen Läsionen während IFN- γ die Erkrankung limitiert [119].

Während in der Mehrheit der Versuchstiermodelle eine Th₁-Antwort ein Promotor kardialer Schädigungen bei der Myokarditis war und die Th₂-Antwort eher protektiv wirkte, scheint in einigen Mausstämmen ein reziproker Effekt durch die Th-Subtypen zu bestehen.

1.4 Die extrazelluläre Matrix

1.4.1 Bestandteile der extrazellulären Matrix

Die extrazelluläre Matrix (ECM) ist ein komplexes Netzwerk aus fibrillären und nichtfibrillären Kollagenen, Glykoproteinen wie Laminin und Fibronectin, sowie verschiedenen Proteoglykanen und Glucosaminoglykanen [120]. Die Ordnung der ECM wird durch ein dynamisches Gleichgewicht zwischen Synthese und Abbau der einzelnen Komponenten aufrechterhalten [120].

Dabei ist die ECM nicht nur eine inerte Ansammlung von Strukturmolekülen, sondern hat bedeutende Aufgaben bei der kardialen Funktion. Kollagen Typ I bildet dicke, parallel angeordnete Fibrillen und hat mit etwa 85% den größten Anteil an der myokardialen ECM [121]. Kollagen Typ III bildet feine Fibrillen und ist mit etwa 11% vertreten [121]. In geringeren Anteilen sind aber auch noch andere Strukturproteine wie Kollagen Typ IV und V, Laminin, Fibronectin vorhanden [120]. Der Aufbau der kardialen Matrix ist entscheidend für die hämodynamischen Eigenschaften, wobei Kollagen Typ I für die Steifheit und Kollagen Typ III für die Elastizität wichtig sind [122]. So wurden bei der dilatativen Kardiomyopathie Änderungen der Ratio Kollagen Typ I / Typ III zugunsten des Typ-I-Kollagens beobachtet [122-124]. Daneben ist die ECM Substrat für Zelladhäsionen und kann durch Bindung an Integrinrezeptoren die zellulären Funktionen von Kardiomyozyten, Endothelzellen, glatten

Muskelzellen und Immunzellen beeinflussen [125]. Ferner stellen Proteoglykane ein bedeutsames Reservoir für Wachstumsfaktoren dar [126].

Die Expression der ECM-Komponenten wird durch Zytokine reguliert. Die genaue Funktionsweise der Regulation ist noch nicht detailliert bekannt. Ein wichtiges Zytokin in vivo ist TGF- β , welches durch aktivierte Makrophagen, T-Lymphozyten, Epithel- und Endothelzellen produziert wird. TGF- β erhöht nicht nur die Expression von ECM-Komponenten, sondern kann auch zu einer verringerten Expression von matrixabbauenden Enzymen führen [127]. Weiterhin induziert dieser Faktor die Expression von Zelloberflächenrezeptoren für Matrix-Komponenten, wodurch die ECM Einfluss auf die Funktion von Immun- und Nichtimmunzellen ausüben kann [128]. Weitere Zytokine, welche die Produktion von ECM-Bestandteilen in größerem Umfang beeinflussen können, sind IL-1 β und TNF- α [129].

1.4.2 Remodeling der extrazellulären Matrix

Als Remodeling wird die qualitative und quantitative Umgestaltung der extrazellulären Matrix bezeichnet, die mit weiteren zellulären Veränderungen wie Kardiomyozytenhypertrophie, Fibroblastenproliferation und Nekrose einhergehen kann [120,130]. Physiologischerweise liegt der tägliche Kollagenumsatz im linken Ventrikel bei 5 – 9% und kann bei verschiedenen kardialen Erkrankungen auf über 50% ansteigen [131-134]. Auch bei der akuten Myokarditis [135-138] und der dilatativen Kardiomyopathie [122-124,139] konnte ein pathologisches Remodeling nachgewiesen werden. Durch den erhöhten Kollagenumsatz kommt es zu einer verminderten Quervernetzung der Kollagenfibrillen [140,141] und zu einer Veränderung des Verhältnisses von Typ I- zu Typ III-Kollagen [122-124], wodurch die kardiale Funktion beeinträchtigt wird. Diese Umbildung der Kollagenstruktur vollzieht sich durch ein komplexes Zusammenwirken von Wachstumsfaktoren, Zytokinen und Proteasen [142]. Auch proinflammatorische Zytokine können die Synthese von ECM-Strukturbestandteilen beeinflussen. Dabei hemmen IL-1 β und TNF- α die Kollagensynthese, während sie die Fibronectin-Synthese stimulieren [143,144]. TGF- β zeigt einen stimulierenden Effekt auf die Synthese von Kollagenen [145], Fibronectin [128], Proteoglykanen und Elastinen [146,147]. In mehreren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass myokardiales Remodeling mit Veränderungen im MMP-TIMP-System assoziiert ist [148,149] und durch therapeutische MMP-Inhibition abgeschwächt werden kann [142, 150].

1.4.3 Regulation der Matrixmetalloproteinasen und deren Inhibitoren

ECM-Komponenten können von einer Vielzahl von Proteinasen abgebaut werden. Die Schlüsselenzyme im Prozess der ECM-Degradation sind neben den Aspartat- und Cysteinproteinasen vor allem die Serinproteinasen und die Matrixmetalloproteinasen (MMP) [151]. Die Serinproteinase Plasmin und die Plasminogenaktivatoren u-PA und t-PA werden oft direkt an die ECM gebunden vorgefunden [142]. Die Hauptaufgabe von Plasmin ist die Spaltung von Fibrin [142]. Plasmin kann jedoch zusätzlich Proteoglykane, Laminin, Fibronectin und Kollagen Typ III abbauen [151]. Daneben ist das Plasmin/Plasminogenaktivator-System auch an der Aktivierung einiger MMP beteiligt [142]. Allgemein werden jedoch die MMP als die wichtigsten Faktoren für die Matrixdegradation in vivo angesehen [152].

Zur Zeit sind über 20 Mitglieder der MMP-Familie bekannt. Diese werden nach ihrer Substratspezifität bzw. ihrer Lokalisation in vier Gruppen unterteilt [142]:

- Kollagenasen (MMP-1, MMP-8, MMP-13) spalten vor allem fibrilläre Kollagene,
- Gelatinasen (MMP-2, MMP-9) bauen vornehmlich denaturiertes Kollagen (Gelatin) und Kollagen Typ IV ab,
- Stromelysine (MMP-3, MMP-7, MMP-10) haben ein weites Spektrum extrazellulärer Substrate, wie Kollagene, Gelatin, Fibronectin, Laminin und Proteoglykane,
- membran-type MMP (MT1-MMP bis MT6-MMP) sind membranständige Proteine, die neben dem Abbau der ECM vor allem an der Aktivierung anderer MMP beteiligt sind (vergleiche Kapitel 1.4.3.4) [153].

MMP sind in verschiedenen physiologischen und pathologischen Prozessen involviert, so auch bei der Entzündung [154] und der dilatativen Kardiomyopathie [155].

Zu den potenten MMP-produzierenden Zellen gehören Fibroblasten, Kardiomyozyten, Endothelzellen, neutrophile Granulozyten und Makrophagen sowie viele Tumorzellen [150].

Entsprechend ihrer folgenschweren Funktion werden MMP auf drei Ebenen reguliert (vergleiche Abb. 3) [142,156,157]:

- Regulation der Transkription durch verschiedene Mediatoren,
- Aktivierung der Proenzyme,
- Interaktion mit Inhibitoren der MMP.

Bemerkenswerterweise können MMP auch Zytokine aktivieren. Zwei Gruppen beschrieben, dass TNF- α , welches die MMP auf verschiedenen Ebenen reguliert, selbst durch MMP und ECM-Fragmente aktiviert werden kann [158,159]. Es konnte demonstriert werden, dass diese Aktivierung durch Gabe von MMP-Inhibitoren gehemmt und durch weitere Zugabe von Kollagenasen, Gelatinasen und Stromelysinen wieder mobilisiert werden konnte [158,159].

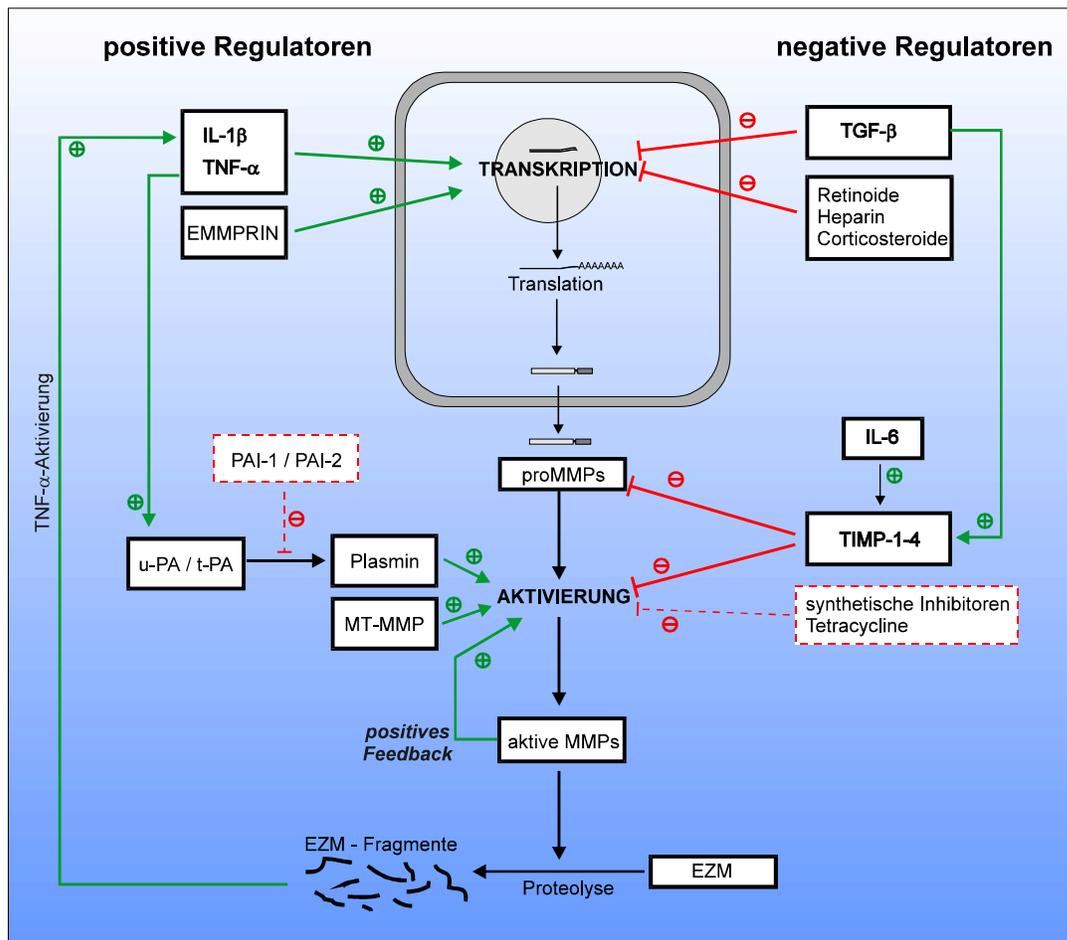


Abb. 1.3: Übersicht über die Regulation der Transkription und Aktivierung der proMMP sowie der Inhibition ihrer proteolytischen Aktivität (in Anlehnung an [142,151]).

1.4.3.1 Regulation der MMP-Expression

Die Synthese von MMP wird von einer großen Zahl an Zytokinen, Hormonen und Tumorprodukten beeinflusst [160]. Insbesondere für IL-1 und TNF- α wurde ein stimulierender Effekt auf die mRNA-Expression von MMP beschrieben, wohingegen andere Mediatoren wie TGF- β die Genexpression deutlich reduzieren [161]. TGF- β zeigt dabei gegensätzliche Einflüsse auf verschiedene MMP, da es die Expression von Kollagenasen wie MMP-1 und MMP-3 senkt [162], aber die Synthese von Gelatinasen wie MMP-2 und MMP-9 erhöht [162,163]. Die Regulation der Genexpression erfolgt regelmäßig über Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren, vor allem TRE, PEA-3 und AP-1, in den MMP-Genen [156].

Zudem konnte gezeigt werden, dass auch ECM-Komponenten [164,165] – insbesondere lösliches Kollagen – die Expression von MMP-1 in Makrophagen [166] bzw. von MMP-1, MMP-3 und MMP-9 in Fibroblasten [167] induzieren können.

Tabelle 1.1: Übersicht über den bisher bekannten Einfluss von Zytokinen und anderen Mediatoren auf die mRNA-Expression der hier untersuchten MMP und TIMP

Pfeile stehen für Induktion (\uparrow), Hemmung (\downarrow) oder kein Effekt (\leftrightarrow) durch den entsprechenden Regulator.

Mediator	MMP-2	MMP-3	MMP-9	MMP13	MT1-MMP	TIMP-1	TIMP-2	TIMP-3	TIMP-4
IL-1 β	\uparrow [168]	\uparrow [169,170]	\uparrow [169,171]	\uparrow [172] \leftrightarrow [173]	\uparrow [172,174]	\downarrow [169]	\leftrightarrow [169,173]	\downarrow [175]	\leftrightarrow [176]
IL-4	\downarrow [177]	\downarrow [151,178]	\downarrow [178]			\uparrow [179] \leftrightarrow [180]			
IL-6		\leftrightarrow [180]		\leftrightarrow [173]		\uparrow [180,181]	\leftrightarrow [173,181]	\uparrow [182]	
TGF- β_1	\uparrow [163]	\downarrow [162]	\uparrow [162,163]	\leftrightarrow [173]		\uparrow [183,184]	\leftrightarrow [173]	\uparrow [185]	
TNF- α	\uparrow [168]	\uparrow [169]	\uparrow [169,171]			\uparrow [169,179]	\leftrightarrow [169,173]	\downarrow [175]	\leftrightarrow [176]
IFN- γ	\downarrow [168]	\downarrow [163,178]	\downarrow [178,180]		\downarrow [187]	\uparrow [179]	\leftrightarrow [187]	\downarrow [175]	
EMMPRIN	\uparrow [188]	\uparrow [188,189]							

1.4.3.2 Aktivierungswege der proMMP

Obwohl für MMP-11 und MT1-MMP die intrazelluläre Aktivierung im Golgiapparat durch die Proteinase Furin der wichtigste Aktivierungsweg ist [153,190,191], werden die meisten anderen MMP als inaktives Proenzym in den extrazellulären Raum sezerniert und bleiben dort als Speicher für eine schnelle Aktivierung an ECM-Komponenten gebunden [142]. Die Aktivierung der proMMP erfolgt schrittweise durch verschiedene Proteinase, wobei die einzelnen MMP eine gewisse Affinität für einige Proteinase haben [192].

Neben den verschiedenen Proteinase wie Plasmin, Trypsin und Kallikrein sind speziell aktivierte MMP – vor allem MMP-3 [151,192] – in der Lage weitere proMMP im Sinne einer positiven Rückkopplung zu aktivieren [161]. Dabei scheint MMP-3 die Rolle eines initialen Aktivators zu übernehmen, da es als einziges MMP nur durch unspezifische Proteinase aktiviert wird, selber aber beinahe alle bekannten MMP aktivieren kann [192]. Plasmin scheint dabei die bedeutendste unspezifische aktivierende Proteinase zu sein, da die wichtigsten Induktoren der MMP-Expression IL-1 und TNF- α auch den Plasminogenaktivator u-PA induzieren [193]. In der Tat enthält der u-PA-Promoter mit AP-1 und PEA-3 die gleichen Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren wie MMP-1 und MMP-3 [156,194]. Daher scheint die koordinierte Induktion von MMP und u-PA eine proteolytische Kaskade zu aktivieren, die effizient zur Matrixdegradation führt [194]. Andererseits inhibiert TGF- β ebenso wie die MMP-Expression auch die Aktivität von u-PA und t-PA in vielen Zellen und führt zur erhöhten Aktivität des Plasminogenaktivator-Inhibitors (PA-I) [195]. Sobald die MMP aktiviert wurden, sind sie in der Lage alle ECM-Komponenten abzubauen.

1.4.3.3 Inhibition der MMP-Aktivität

Aktivierte MMP und teilweise aktivierte MMP-Intermediate werden spezifisch durch die Gruppe der „tissue inhibitor of metalloproteinases“ (TIMP) [142,151,192] und weniger spezifisch durch α_2 -Makroglobulin gehemmt [151]. Zur Zeit sind vier TIMP identifiziert, wobei TIMP-1 und TIMP-2 am besten charakterisiert sind [192,196]. Dabei ist die Expression von TIMP-2 im Gegensatz zu TIMP-1 weitgehend konstitutiv [151,192], scheint aber der Expression von MMP-2 und MMP-9 zu folgen [197,198]. Über die Regulation des neuesten Mitglieds der TIMP-Familie, TIMP-4, liegen bislang nur wenige Daten vor. Es scheint aber ähnliche Promoterregionen für Transkriptionsfaktoren wie TIMP-1 zu enthalten [199]. Hauptexpressionsort bei Mäusen ist vor allem das Herz [199].

Wichtigster Induktor der TIMP-1-Expression ist TGF- β [200], welcher auch einer der wichtigsten Suppressoren der MMP-Expression ist (vergleiche Tabelle 1.1). Dagegen reduzieren die wichtigsten Induktoren der MMP-Expression IL-1 und TNF- α wiederum die TIMP-1-Expression [142,192]. IL-6 hat neben seiner TIMP-stimulierenden Wirkung noch eine weitere matrixprotektive Funktion, indem es die hepatische Synthese von α_2 -Makroglobulin erhöht [181].

Die inhibitorische Wirkung der TIMP geschieht auf zwei Ebenen, zum einen indem sie aktive MMP hemmen [142,151,192] und zum anderen indem sie die Aktivierung von inaktiven MMP-Vorstufen durch ihre Bindung verhindern können [181]. Der Matrixabbau ist demnach abhängig vom Verhältnis zwischen aktiven MMP und TIMP. Studien konnten weiter aufzeigen, dass die Downregulation von TIMP-1 mit der Kollagendegradation korreliert [141].

1.4.3.4 Membranassoziertes Induktions- / Aktivierungs-System

Im linksventrikulären Myokard konnte von Spinale et al. [155] ein zellmembrangebundenes System nachgewiesen werden, das bei dilatativer Kardiomyopathie stärker exprimiert war. Es handelt sich dabei um EMMPRIN (*extracellular matrix metalloproteinase inducer*), ein Induktor der MMP-Expression, und MT1-MMP (*membrane-type-1-MMP*) als membranassozierten Aktivator sezernierter proMMP (siehe Abb. 1.4).

Bisher konnte gezeigt werden, dass die Exposition von humanen Fibroblastenkulturen mit EMMPRIN zu einer Induktion von MMP-1, MMP-2 und MMP-3 führt [188,189,201]. Inwiefern die mRNA-Expression anderer MMP beeinflusst wird und auf welche Weise EMMPRIN die MMP-Expression induziert ist unklar. Möglicherweise geschieht dies über Zell-Zell-Interaktionen oder über einen parakrinen Effekt [201,202].

Der Aktivator im oberflächengebundenen System, die MT1-MMP, konnte in einer Vielzahl von Zellsystemen zur MMP-Aktivierung führen [203]. Dabei scheint MT1-MMP besonders wichtig für die Aktivierung von proMMP-13 [192,204] und proMMP-2 zu sein [192]. Bei der Aktivierung von proMMP-2 wird ein MT1-MMP/proMMP-2/TIMP-2-Komplex gebildet [205], wobei die Aktivierung dosisabhängig von TIMP-2 ist: Niedrige Konzentrationen von TIMP-2 führen zur Aktivierung, während hohe Konzentrationen den membranassozierten Aktivierungsweg hemmen [203]. Daneben ist MT1-MMP auch wichtig für den perizellulären Abbau von ECM-Substraten wie Kollagen Typ I-III [206], Fibronektin und Proteoglykanen [191].

Diesem System wird eine wichtige Rolle bei der perizellulären Matrixdegradation und Aktivierung von proMMP zugeschrieben, nicht zuletzt, weil seine Funktion durch endogene Inhibitoren wie TIMP-1 nicht gehemmt wird [189,203].

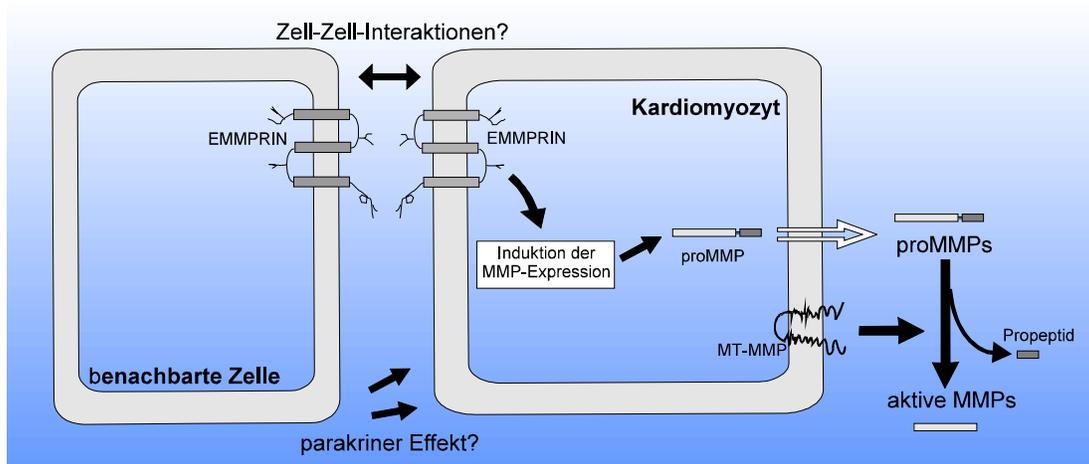


Abb. 1.4: Schematische Darstellung des membranassoziierten Induktions-Aktivierungs-System an der Oberfläche von Kardiomyozyten.

(in Anlehnung an [155])

1.5 Problemstellung

Die Untersuchung der viralen Myokarditis beim Menschen ist mit erheblichen Problemen verbunden. Speziell die niedrige Inzidenz der Erkrankung und die häufig unspezifische Klinik erschweren die Erhebung ausreichend statistisch gesicherter Daten. Daneben war der spezifische Virusnachweis in Myokardbiopsien lange Zeit schwierig und die Diagnose stützte sich vor allem auf histopathologische und serologische Daten.

Nur wenige Studien untersuchten bisher den Einfluss einer immunmodulatorischen Behandlung oder den Einfluss von Veränderungen im MMP-/TIMP-System auf die hämodynamische Funktion bei muriner Myokarditis: Eine Studie untersuchte den Einfluss einer Immunmodulation mit IL-10, einem Th₂-Zytokin, bei Autoimmunmyokarditis [207]. Eine andere beschäftigte sich mit dem Einfluss einer TIMP-1-Depletion [208] auf die kardiale Funktion. Zu einer Behandlung mit IL-4 bei akuter viraler Myokarditis liegen bislang keine Daten vor. Auch Untersuchungen zu hämodynamischen Veränderungen, welche in der Kardiologie zur Standarddiagnostik gehören und bei vielen kardialen Erkrankungen ausschlaggebend für die Diagnosestellung und zur Überwachung des Verlaufs sind, wurden im Tiermodell bei Myokarditis nur selten durchgeführt. Stattdessen erfolgten anfangs nur elektrophysiologische Untersuchungen zur akuten CVB3-Myokarditis [209,210] und erst in letzter Zeit wurden zunehmend auch einige hämodynamische Untersuchungen bei der Virusmyokarditis [37,211-213] vorgenommen.

Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit der Einfluss einer exogenen Immunmodulation mit IL-4 auf die myokardiale Inflammation und matrixmodifizierende Faktoren sowie die hämodynamische Funktion bei experimenteller akuter Virusmyokarditis an CVB3-infizierten Balb/c-Mäusen untersucht. Diese Tierart bot sich an, da sie ein dem Menschen vergleichbares Krankheitsbild zeigt [22,23], gut in großen Populationen unter vergleichbaren Bedingungen zu halten ist und sich durch die Verwendung von Inzuchtstämmen wie Balb/c genetisch völlig identische Studienobjekte vergleichen lassen. In mehreren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass sich durch eine experimentelle CVB3-Infektion bei diesem Mausstamm eine dem Menschen ähnliche Entzündung des Herzens auslösen lässt [28,214,215].

Die vorliegende Arbeit versuchte folgende Fragen zu klären:

1. Zu welchen Veränderungen in der mRNA-Expression proinflammatorischer Zytokine kommt es in der Akutphase einer CVB-3-Myokarditis bei BALB/c-Mäusen? Ist das Zytokinprofil charakteristisch für eines der Th-Antworten? Ist dabei ein Einfluss auf die kardiale Funktion ersichtlich?
2. Wie verändert sich die Expression und Aktivität von wichtigen matrixregulierenden Enzymen? Welchen Effekt hat eine CVB-3-Infektion auf das kürzlich entdeckte membranassoziierte Induktions-Aktivierungs-System aus MT1-MMP und EMMPRIN?
3. Inwiefern lassen sich alle diese Veränderungen durch Immunmodulation mit dem Zytokin IL-4 und damit Induktion einer Th₂-Immunantwort beeinflussen? Führt die exogene IL-4-Zufuhr zu einer Veränderung der Infiltratzusammensetzung? Lässt sich dadurch die Verteilung myokardialer Läsionen beeinflussen?