

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

DISSERTATION

**Erniedrigte Frequenz von FoxP3⁺ regulatorischen T-Zellen
im peripheren Blut von Patienten mit
akuter Myokarditis und dilatativer Kardiomyopathie**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Yvonne Stechling
aus Berlin

Gutachter: 1. Herr Prof. Dr. med. H.- P. Schultheiß
2. Herr Priv.- Doz. Dr. med. R. Vetter
3. Herr Prof. Dr. med. A. Staudt

Datum der Promotion: 19. November 2010

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	5
1.1	Epidemiologie und Ätiologie der DCM	6
1.2	Klinik und Verlauf der Myokarditis und DCM	7
1.3	Pathogenese der DCM	8
1.4	Diagnostik	13
1.5	Therapie der Myokarditis und DCM	14
1.6	T-Zell Toleranz und Periphere Toleranzmechanismen	15
1.7	Regulatorische T-Zellen	17
1.8	Transkriptionsfaktor FoxP3	19
1.9	Zielsetzungen der Arbeit	21
2	Material und Methodik	22
2.1	Patienten und Kontrollen	22
2.2	PBMCs	23
2.2.1	Präparation von PBMCs aus dem Blut	23
2.2.2	Einfrieren von Zellen	23
2.2.3	Auftauen von Zellen	24
2.2.4	Vergleich von frischen und aufgetauten PBMCs	24
2.3	FACS-Analyse	25
2.3.1	Antikörper	25
2.3.2	Testung von Anti-CD25-Antikörpern	25
2.3.3	FACS-Durchflusszytometrie	26
2.3.4	Markierungen von Antigenen	27
2.3.5	Präparationen der Färbepuffer	29
2.4	Statistische Auswertung	29
3	Ergebnisse	30
3.1	Patientengruppen	30
3.2	Symptome und Symptombdauer	30
3.2.1	Anamnestische Parameter	31
3.3	Laborwerte	32
3.4	Stadieneinteilung nach NYHA	34
3.5	EKG Veränderungen	35
3.6	Echokardiografie	36

3.6.1	Linksventrikuläre Ejektionsfraktion (LVEF).....	37
3.6.2	Weitere echokardiographisch Parameter	38
3.7	Viruspositivität	41
3.8	Regulatorische T-Zellen/FoxP3	42
4	Diskussion	48
4.1	Immunantwort	48
4.2	die Rolle regulatorischer T-Zell Frequenzen	49
4.3	Isolierung und Markierung regulatorischer T- Zellen	51
4.4	Relevanz regulatorischer T- Zellen bei Erkrankungen	55
4.5	Schlussfolgerung.....	57
5	Zusammenfassung.....	58
6	Literaturverzeichnis.....	60
7	Abkürzungsverzeichnis	71
8	Danksagung	72
9	Lebenslauf.....	73
10	Selbständigkeitserklärung.....	74

1 Einleitung

Die dilatative Kardiomyopathie (DCM) wurde dem WHO (*World Health Organization*) *Task Force Report* aus dem Jahre 1980 als eine primäre Herzmuskelerkrankung heterogener Ätiologie klassifiziert (1). Die DCM ist gekennzeichnet durch eine Dilatation insbesondere des linken Ventrikels (LV), größtenteils auch mit Beteiligung des rechten Ventrikels (RV) im Sinne einer biventrikulären Dilatation, die sowohl mit einer Einschränkung der linksventrikulären Ejektionsfraktion (LVEF), aber auch mit Störungen der diastolischen Funktion (Compliance) einhergeht (2). Interstitielle Fibrose und strukturelle Alterationen der extrazellulären Matrix mit konsekutiver Herabsetzung der Relaxation bedingen eine initiale diastolische und später systolische Funktionsstörung. Eine koronare Herzerkrankung wie auch andere Ursachen für die Herzinsuffizienz (z.B. arterieller Hypertonus, ursächliche signifikante Vitien) sind Ausschlusskriterien für die DCM (2-4). Neben der idiopathischen DCM mit unbekannter Ursache unterscheidet man die sekundären Kardiomyopathien im Sinne eines Folgezustands verschiedener Erkrankungen.

Es besteht eine ätiopathogenetische Assoziation zwischen der akuten Myokarditis (AMC) und der dilatativen Kardiomyopathie (DCM) (2, 5). Kardiotope Viren (am häufigsten das Parvovirus B19; mittels nested PCR (nPCR) ermittelt und eine intramyokardiale Entzündung (Immunhistologie) können in Endomyokardbiopsien (EMBs) von ca. 60% der Patienten mit der klinischen Präsentation einer AMC oder DCM nachgewiesen werden, was mit der WHO-Definition einer „inflammatorischen Kardiomyopathie“ (DCMi) konform ist (32,49,59). Insbesondere die Viruspersistenz ist mit einer progredienten Einschränkung der linksventrikulären Ejektionsfraktion (LVEF) sowie einer signifikant erhöhten Mortalität assoziiert (6-8). Darüber hinaus hat die antikardiale humorale Immunität eine prognostische Rolle (9, 10). Nach einer akuten Myokarditis (AMC) hat jedoch der immunhistologische Nachweis einer DCMi eine entscheidende prognostische Rolle für die Mortalität und die Entwicklung einer herztransplantationspflichtigen DCM (11).

Die antivirale Immunantwort bei DCMi ist unvollständig verstanden (12-14). Die Rolle von regulatorischen T-Zellen (Tregs), die durch den Transkriptionsfaktor FoxP3 charakterisiert werden, ist bei der humanen DCMi bislang nicht untersucht. Tregs könnten einerseits vor einer überschiessenden, gewebsdestruierenden

Immunantwort schützen, andererseits aber auch die effektive Viruselimination über die Hemmung der antiviralen Immunantwort fördern. Bei zwei Autoimmunerkrankungen (*graft versus host disease* / *GVHD* und der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen) sind kürzlich erniedrigte Frequenzen von sich im Thymus entwickelten $CD4^+CD25^{++}$ (high) bzw. $FoxP3^+$ Tregs in mononukleären Zellen (PBMCs) beschrieben worden. Hingegen wiesen Patienten mit einer akuten Divertikulitis erhöhte $FoxP3^+$ Frequenzen auf, was die Regulierbarkeit der Tregs in PBMCs bei unterschiedlichen immunvermittelten Erkrankungen verdeutlicht (15, 16).

1.1 *Epidemiologie und Ätiologie der DCM*

Die DCM ist mit einer Inzidenz von 6 pro 100.000 Einwohner und einer Prävalenz von 36 pro 100.000 Einwohner die häufigste Herzmuskelerkrankung und ist neben der koronaren Herzerkrankung die bedeutendste Indikation für eine Herztransplantation. Es sind jährlich 3,8 Todesfälle pro 100.000 Einwohner auf eine DCM zurückzuführen (1,54). Der Altersgipfel bei Erstdiagnose ist im mittleren und im jugendlichen Alter angesiedelt. Männer sind in einem Verhältnis von 3:1 häufiger betroffen als Frauen (17-20).

Allerdings lässt sich sagen, dass epidemiologische Daten zur akuten Myokarditis (AMC) derzeit nur eingeschränkt zur Verfügung stehen. Ein Grund hierfür liegt in der mutmaßlich hohen Häufigkeit der myokardialen Beteiligung bei Virusinfekten. Da hierbei oft nur geringe Symptome auftreten, wird hier die klinische Relevanz verkannt. Eine detaillierte Diagnostik an kardiologischen Zentren bleibt somit mutmaßlich sehr häufig aus. Demzufolge ist die Dunkelziffer dieses Krankheitsbildes als hoch anzusiedeln. Patienten mit einer histologisch gesicherten Myokarditis haben eine 10-Jahres-Überlebensrate von 45%, was belegt, dass die Myokarditis per se keine harmlose Erkrankung ist, und dass es gilt, die prognostisch relevanten Faktoren und Konstellationen zu eruieren.

Ätiologisch lassen sich die idiopathische, virale, autoimmunologische, toxische (u.a. alkohol- oder medikamenteninduziert) und familiär-hereditäre Formen unterscheiden (2, 10, 21-27). Die DCM kann auch mit einer bekannten kardiovaskulären Herzerkrankung in Verbindung gebracht werden, wobei sich hier das Ausmaß der myokardialen Dysfunktion nicht alleine durch den Umfang der ischämischen

Schädigung oder durch die pathologischen Bedingungen der Hämodynamik erklären lässt. Eine DCM ist bei Nachweis einer Viruspersistenz und/oder einer immunhistologisch detektierten intramyokardialen Entzündung (DCMi) prognostisch entscheidend schlechter eingestuft, während die histologische Diagnostik der aktiven oder grenzwertigen Myokarditis nach den Dallas Kriterien keine prognostische Aussagekraft hat (6-9, 11, 28).

1.2 Klinik und Verlauf der Myokarditis und DCM

Ein spezifisches, pathognomonisches Symptom der akuten Myokarditis (AMC) existiert nicht. Sie kann vollkommen asymptomatisch auftreten, aber auch mit Belastungsintoleranz, atypischer Angina pectoris bis hin zur Herzinfarkt-ähnlichen Präsentationen oder diversen Herzrhythmusstörungen wie Extrasystolie, AV-Block, Schenkelblock, Vorhofflimmern und ventrikuläre Tachykardien einhergehen. Häufig besteht eine zeitliche Assoziation zu einem Infekt des respiratorischen und/oder gastrointestinalen Traktes. Ein Perikarderguss kann nachweisbar sein (3, 5, 29, 30).

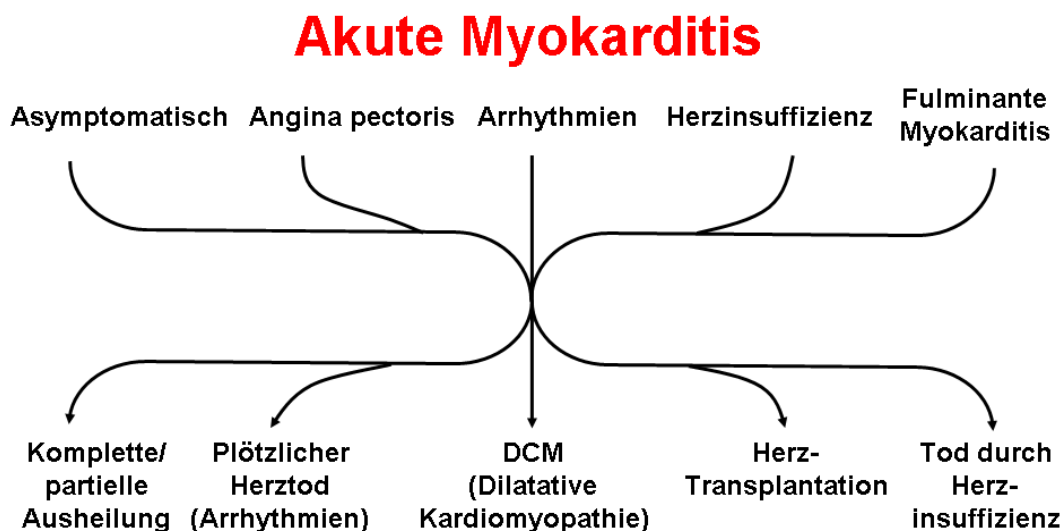


Abb.1: Unterschiedliche klinische Präsentationen der akuten Myokarditis (AMC) und differente klinische Verläufe unter konventioneller Herzinsuffizienz-Therapie. (Übersetzt und modifiziert nach (5)).

Die Klinik zeichnet sich durch ein Vorwärts- und Rückwärtsversagen des linken Ventrikels aus (29, 31). Mit weiterer Progression der Erkrankung kann die Linksherzinsuffizienz in eine Globalinsuffizienz münden und wird dann mit Zeichen der Rechtsherzbelastung symptomatisch. Im Vordergrund der DCM steht die belastungsabhängige Dyspnoe sowie die körperliche Schwäche. Hier kann eine Einteilung nach den Richtlinien der New York Heart Association (NYHA) vorgenommen werden. Aufgrund der unzureichenden Leistung des rechten Ventrikels kommt es zu einem Rückstau des Blutes in den großen Kreislauf, der zu einem Anstieg des Venendrucks führen kann. Symptomatisch können sich eine relative Trikuspidalklappeninsuffizienz, Halsvenenpulsationen, periphere Ödeme, Hepatomegalie, eine Stauungsleber (Aszites) oder gastrointestinale Störungen wie z.B. eine Stauungsgastritis entwickeln. Atemnot und präkardiale Beklemmungsgefühle treten bei 25-50% der Patienten aufgrund der erhöhten Wandspannung des Ventrikels sowie der koronaren Minderperfusion der kleinen Gefäße auf. Mit zunehmender Verminderung der Ejektionsfraktion kommt es zu einer Zunahme der Herzrhythmusstörungen und somit steigt die Gefahr von arteriellen und pulmonalen Embolien sowie des plötzlichen Herztodes. Mit zunehmender Herzinsuffizienz findet sich ein verlagerter Herzspitzenstoß, Mitralklappeninsuffizienz-Geräusche und diastolische Extratöne (Galopprrhythmus). Subjektive Arrhythmien und atypische pektanginöse Beschwerden werden häufig beklagt. Die bei der AMC vorkommenden Herzrhythmusstörungen (Extrasystolie, AV-Block, Schenkelblock, Vorhofflimmern, ventrikuläre Tachykardien) können prinzipiell auch bei der DCM auftreten (3, 29).

1.3 Pathogenese der DCM

Die Pathogenese der AMC und der DCM wird in den westlichen Ländern am häufigsten mit einer kardiotropen Virusinfektion assoziiert. In einer Mehrzahl der Fälle kommt es zu einer spontanen Ausheilung. Jedoch kann es auch zu einem Übergang in eine DCM kommen. In einer Metaanalyse konnte gezeigt werden, dass 21% der Myokarditis-Patienten innerhalb einer mittleren Beobachtungsdauer von 33 Monaten eine manifeste DCM entwickeln (5). Lange Zeit war die Virusätiologie der Myokarditis umstritten, da spezifische Methoden fehlten um den positiven Virusnachweis zu erbringen. Erst nach Einführung von sensitiven und spezifischen

molekularbiologischen Techniken wie Slot-Blot, in situ Hybridisierung und Polymerasekettenreaktion (PCR) konnten nun auch geringe Mengen an Virusgenom im Myokard nachgewiesen werden. Mit Hilfe der konventionellen PCR oder der sensitiveren und spezifischeren nested PCR (nPCR) konnten Parvovirus B19 (B19V), humanes Herpes-Virus Typ 6 (HHV6), Coxsackieviren der Gruppe B (CBV) innerhalb der Gruppe der Enteroviren (EV), Adenovirus (ADV), und Epstein-Barr-Virus (EBV), sowie in ausgesuchten Patientengruppen zusätzlich humanes Immundefizienz-Virus (HIV) und das Hepatitis C Virus (HCV) nachgewiesen werden (22, 23, 32-38).

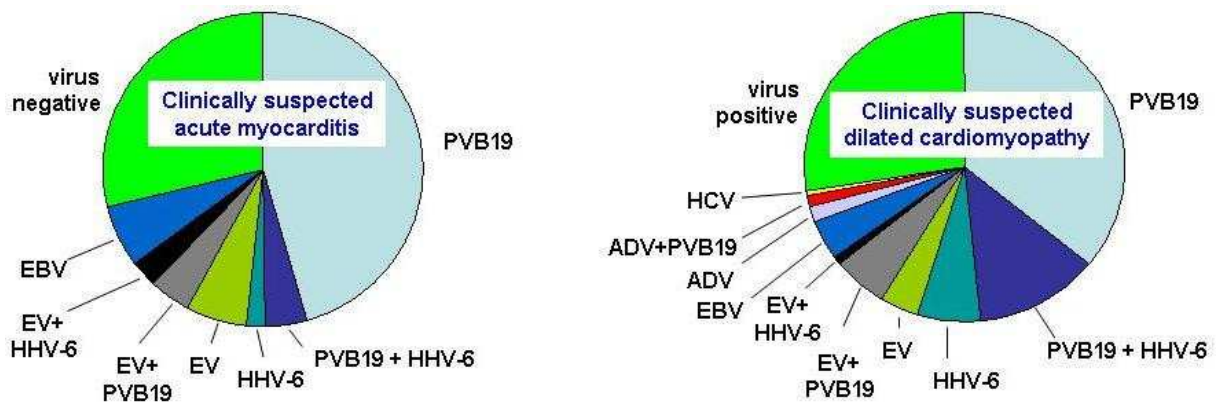


Abb.2: Häufigkeit der Nachweisbarkeit unterschiedlicher kardiotroper Viren in EMBs von AMC- und DCM-Patienten. (Modifiziert nach (22, 23)).

Die Entzündungsreaktion, die durch kardiotropen Viren ausgelöst wird, ist nicht ausschließlich schädlich für das Herz. Es stellt sogar eine protektive, auf die Viruselimination gerichtete, Reaktion dar und limitiert sich durch die Viruselimination selbst. Kommt es jedoch zu einer Autoimmunreaktion, so bleibt die anti- kardiale Immunreaktion trotz Viruselimination erhalten. Es kommt zu einem schädlichen Verlust von Kardiomyozyten. Die anti- kardiale Autoimmunität und der daraus resultierende Kardiomyozytenverlust stellt die Endstrecke der DCM dar. Kardiotrope Viren gelten als die hauptsächlichen Auslöser einer akuten Myokarditis und der sich daraus entwickelnden DCM. Es wird davon ausgegangen, dass eine virale Infektion durch Makrophagen und T-Lymphozyten präsentiert, eine Aktivierung des Immunsystems gegen virale Proteine auslöst. Hierbei entstehen auch Antikörper, die gegen myokardialen Antigene gerichtet sind. Es kommt zu einer Zytokinproduktion,

die einen kardial depressiven und proarrhythmogenen Effekt ausüben kann. Proinflammatorische Zytokine können dann endotheliale und leukozytäre Zelladhäsionsmoleküle (CAMs) induzieren, die die Migration durch das Endothel aktivieren. Sie können sich auch gegen virale Proteine richten und immunkompetente Effektorzellen in das Myokard vermitteln. Pektanginöse Beschwerden, Troponin-/CK-Erhöhungen sowie auch Infarkt-ähnliche Repolarisationsstörungen, die bei einer AMC nachweisbar sind, erklären sich durch immunvermittelte Myozytolyse.

Kommt es nun zu einer schnellen Elimination des viralen Genoms, wird dies auch zur Eliminierung des intramyokardialen Entzündungsauslösers führen. In einigen Fällen kann die intramyokardiale Inflammation jedoch persistieren. Hierzu gibt es zwei Mechanismen.

1. Die Viruspersistenz kann zu einer anhaltenden Aktivierung des Immunsystems gegen virale Proteine führen, auch wenn diese nur in niedriger Kopienzahl auftreten.
2. Bei der immunvermittelten Kardiomyozytolyse werden kardiale Antigene freigesetzt, die unter anderem besonders bei genetisch prädisponierten Individuen zu einer chronischen Autoimmunität führen, die auch ohne virale Persistenz fortbestehen kann.

Beide Mechanismen schließen sich nicht aus und können zur gemeinsamen Endstrecke der DCM führen.

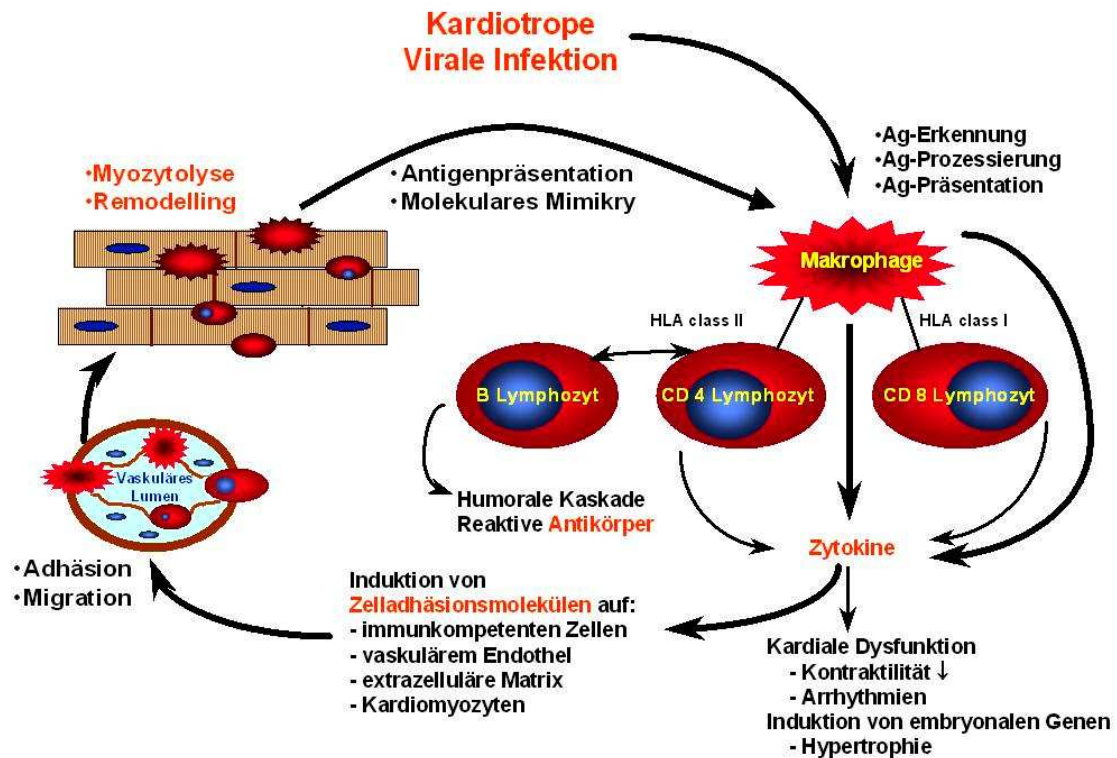


Abb.3: Immunpathogenese der Virus-induzierten inflammatorischen Kardiomyopathie. (Übersetzt und modifiziert nach (39)).

In den letzten Jahren konnten zahlreiche Erkenntnisse zur Pathogenese der DCMi gewonnen werden. Kardiotrope Viren, vorallem Entero- und Adenovirus dringen hauptsächlich über den Gastrointestinaltrakt (Enteroviren) oder den Respirationstrakt (Adenoviren) in den Wirtsorganismus ein. Diese Viren befallen dann primär die Zellen des Immunsystems und erst sekundär die Kardiomyozyten. Dabei können die Viren im retikuloendotheliale System insbesondere in den B-Lymphozyten und Makrophagen persistieren und von dort aus andere Organe wie Herz und Pankreas attackieren (40). Coxsackie- und Adenoviren verwenden ein gemeinsames Adhäsionsmolekül, dem Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor (CAR), um Zielzellen zu infizieren (41). Bei DCM-Herzen, aber nicht bei nicht-DCM-Herzen und Donor-Herzen von Adulten, liegt eine CAR-Induktion auf dem Sarkolemm und den Disci intercalatii der Kardiomyozyten vor (42).

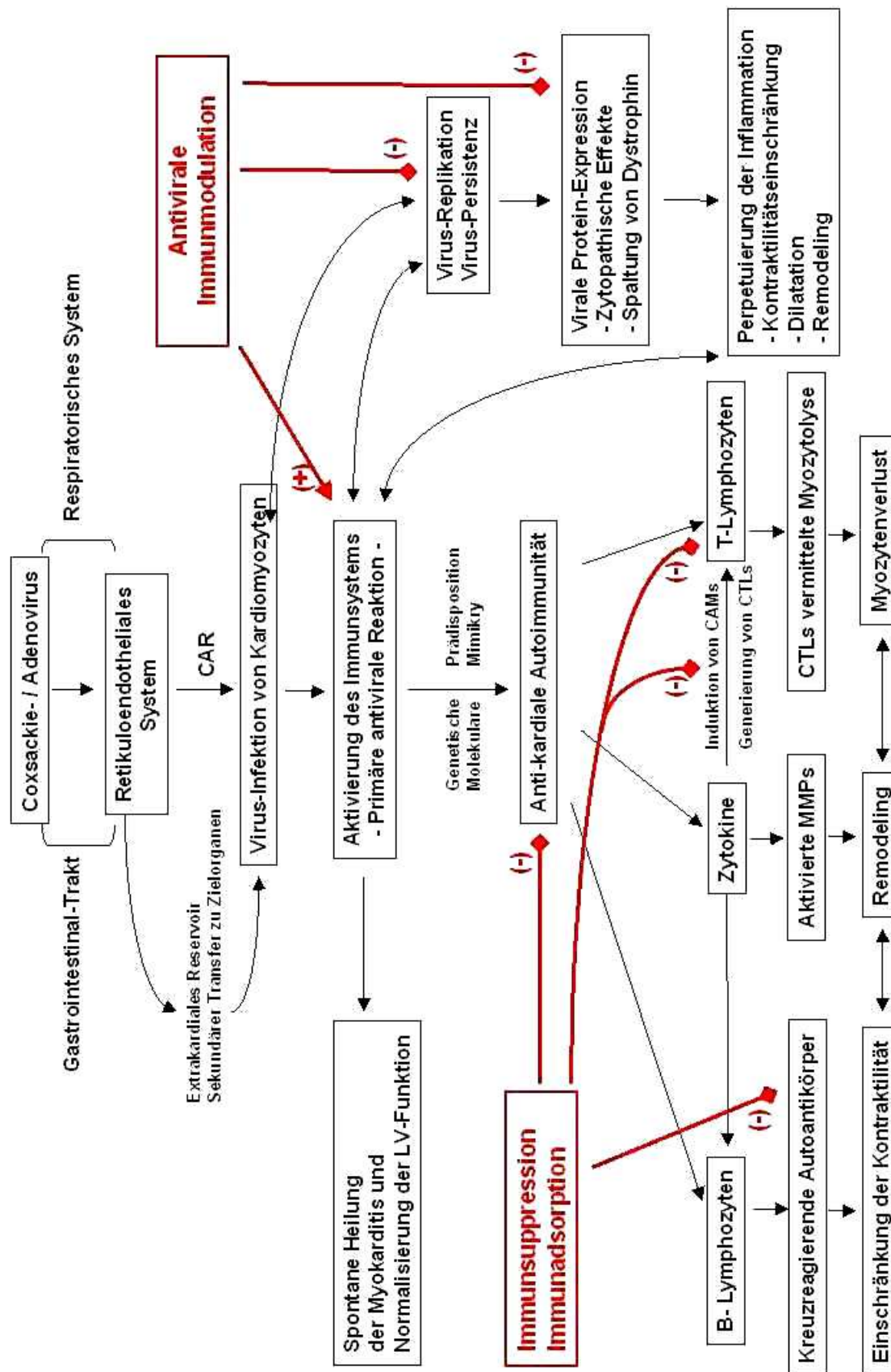


Abb.4: Pathogenese der inflammatorischen Kardiomyopathie und Wirkmechanismen immunmodulatorischer Therapieoptionen. (Übersetzt und modifiziert nach (13)).

1.4 Diagnostik

Sowohl die klinische Präsentation als auch die Prognose von Patienten mit AMC und DCM zeigen eine ausgeprägte Variabilität (3, 5, 29, 43, 44). Die Anamnese sowie weitere Untersuchungen (z.B. EKG, Langzeit-EKG, Echokardiographie, Koronarangiographie, radiologische sowie nuklearmedizinische Untersuchungen) können zwar Hinweise auf eine Herzinsuffizienz geben, jedoch keinesfalls die Ätiologie beweisen. Einerseits können klinische Parameter zur Evaluation der Herzinsuffizienz bei AMC- und DCM-Patienten eingesetzt werden, andererseits haben sie jedoch keinen Stellenwert für die Differenzierung der Pathogenese, Prognose oder immunmodulatorischer Therapieoptionen. Die umfangreiche Diagnostik an Endomyokardbiopsien (EMBs) ist unabdingbar, um entzündliche Herzmuskelerkrankungen eindeutig zu diagnostizieren, deren auslösende Faktoren zu identifizieren, und bietet Ansatzpunkte für erfolgversprechende immunmodulatorische Therapieergebnisse (3, 13, 29, 45).

EMBs Entnahmen zu diagnostischen Zwecken sollten bei einem entsprechenden klinischen Verdacht einer AMC oder DCM durchgeführt werden, nachdem eine mechanische Überbelastung wie kongenitale Vitien, Erkrankungen der Herzklappen, systemisch oder pulmonale Hypertonie sowie andere sekundäre Myokarderkrankungen und eine koronare Mangel durchblutung als Ursache kardialer Beschwerdesymptomatik ausgeschlossen worden sind (2, 3, 13, 29, 46, 47). Die Technik zur Entnahme von Endomyokardbiopsien (EMBs) wurde in den 60' er Jahren entwickelt (48). Sie können vom RV oder vom LV, als auch vom interventrikulären Septum sowie vom atrialen Septum entnommen werden. Die Komplikationsrate von EMBs aus dem RV Septum ist jedoch in erfahrenen Zentren unter Einsatz der heutzutage erhältlichen Biopptome und Herzkathetertechniken vernachlässigbar (11, 49).

Die Aufarbeitung der EMBs mit histologischen Untersuchungstechniken zur Diagnostik von Myokarditiden erfolgt entsprechend der Dallas-Klassifikation (50). Nach den Dallas-Kriterien wird eine aktive Myokarditis bei Nachweis ausgeprägter, fokaler lymphozytärer Infiltrate in Verbindung mit benachbarten Myokardzellnekrosen diagnostiziert. Eine „borderline“ (grenzwertige) Myokarditis liegt vor, wenn lymphozytärer Infiltrate, aber nicht benachbarte Myokardzellnekrosen nachweisbar

sind. Basierend auf diese Dallas-Kriterien wurde eine hohe Variabilität der Myokarditis- Prävalenz bei DCM Patienten (0-63%) beschrieben (45, 51). Diese ist hauptsächlich auf den hohen *sampling error*, da durch die Probengröße fokal vorkommende entzündliche Infiltrate nur zufällig erkannt werden, und auf die hohe *interobserver variability* zurückzuführen (52, 53). Aus diesen Gründen besitzen die Dallas-Kriterien einen geringen Stellenwert in der Diagnostik der DCMi. Diese Einsicht ist mittlerweile breit akzeptiert (11, 14, 39, 45, 46, 51, 54, 55).

Eine Verbesserung der Diagnostik entzündlicher Myokarderkrankungen wurde in den letzten Jahren durch immunhistologische Färbungen erreicht. Hierbei werden Antikörper, die gegen verschiedene Lymphozytenpopulationen, Gewebsmakrophagen und Aktivierungsmarker gerichtet sind, eingesetzt. Als auffällig gelten EMBs mit $>2,0$ CD3/CD2 positiven Lymphozyten pro Gesichtsfeld bei 400-facher Vergrößerung, entsprechend $7,0$ Lymphozyten pro mm^2 (2, 56). Im weiteren Verlauf hat die verstärkte CAMs Expression als zusätzlicher zellenabhängiger Immunmarker eine entscheidende diagnostische Bedeutung gewonnen (11, 21, 57, 58). Immunhistochemische Detektionsverfahren sind den rein histologischen Färbetechniken deutlich überlegen, da in der Regel bei einem subakuten Verlauf einer Myokarditis erst dann eine EMBs-Diagnostik erfolgt, wenn das hyperakute Stadium mutmaßlich bereits überwunden ist, und damit histologisch fassbare charakteristische Veränderungen wie Myozytolysen nicht mehr nachweisbar sind. Die *interobserver variability* entfällt größtenteils bei der immunhistologischen Diagnostik, da hier, im Gegensatz zu der histologischen Diagnostik, die Möglichkeit der digitalen Bildanalyse (DBA) zur beurteilungsunabhängigen quantitativen Evaluation besteht. Bei der immunhistologischen Diagnostik ist neben der Quantifizierung auch eine Identifizierung der einzelnen Phänotypen und somit eine funktionelle Charakterisierung der Infiltrate möglich (39, 59-62).

1.5 Therapie der Myokarditis und DCM

In Abhängigkeit des Schweregrades der klinischen Symptomatik erfolgt neben der körperlichen Schonung eine medikamentöse Therapie. Alkohol ist zu vermeiden. Die medikamentöse Therapie beinhaltet die Richtlinien zur Behandlung der Herzinsuffizienz und sollte unabhängig von den Biopsiefunden (Inflammation, Viruspersistenz) erfolgen. Zur Behandlung gehören Medikamente wie ACE-Hemmer,

AT-1 Blocker, Diuretika, Aldosteron-Antagonisten, Betarezeptorblocker, Herzglykoside und Sympathomimetika. Diese können als Monotherapie oder im Rahmen eines Stufenplanes miteinander kombiniert werden (63). Es ist derzeit unklar, ob die AMC mit erhaltener linksventrikulärer Funktion eine Indikation zu einer frühzeitigen Herzinsuffizienzmedikation zur Verbesserung der Morbidität und Mortalität darstellt. Randomisierte Studien sind hierzu aber auch nicht unbedingt zu erwarten. Bei deutlicher linksventrikulärer Funktionseinschränkung und nachweisbaren intraventrikulären Thromben wird zur Thrombembolie-Prophylaxe eine Antikoagulation für mindestens 6 Monate und bis zur Erholung der linksventrikulären Ejektionsfraktion auf >50% empfohlen.

Zu den immunsuppressiven Medikamenten, die im Rahmen der DCMi eingesetzt worden sind, zählen z.B. Corticosteroide und Azathioprin, die sich gegen die chronische intramyokardiale Entzündungsreaktion richten (57, 64, 65). Zum anderen kann eine antivirale Immunaktivierung mittels Interferon eine Viruselimination erzielen (13, 66-68). Aufgrund des variablen Spontanverlaufes der Myokarditis sollte zwischen den Biopsien ein zeitlicher Mindestabstand von drei bis vier Monaten liegen. Azathioprin und Prednisolon können sich positiv auf myokardiale Entzündungsreaktionen bei immunhistologisch positiven Endomyokardbiopsien und fehlendem Virusnachweis auswirken. Jedoch besteht bei positivem Virusnachweis die Gefahr der zusätzlichen viralen Ausbreitung bzw. Reaktivierung infolge der Immunsuppression. In diesem Falle sollte auf eine immunsuppressive Therapie verzichtet werden (13, 65).

1.6 T-Zell Toleranz und Periphere Toleranzmechanismen

Die Hauptaufgabe des spezifischen Immunsystems liegt in der Unterscheidung zwischen Selbst- und Fremd- Antigenen und die Bildung eines spezifischen immunologischen Gedächtnisses. T-Zellen erkennen dabei mittels ihres T- Zell Rezeptors (TCR) körpereigene veränderte Zellen wie z. Bsp. eine Virus- infizierte Körperzelle. Der TCR der CD4⁺ Th-Zellen erkennt dabei ein antigenes Peptid im Komplex mit eigenen MHC Klasse II Molekülen (*major histocompatibility complex*). CD 8⁺ T-Zellen dagegen erkennen ein antigenes Peptid im Komplex mit eigenen MHC Klasse I Molekülen. Die Fremd-Erkennung unterliegt einem engen Kontrollsystem. Die Entwicklung und Auslese der T-Lymphozyten erfolgt im Thymus.

Autoreaktive T-Zellen werden durch die Bindung ihrer Rezeptoren an die im Thymus vorliegenden Selbstantigene erkannt und eliminiert. Die meisten Selbstantigene werden im Thymus auf den Stromazellen bzw. auf den dendritischen Zellen exprimiert oder durch wandernde, antigenpräsentierende Zellen, insbesondere durch Monozyten/Makrophagen und B- Zellen, dorthin transportiert. Auf diese Weise werden Antigene im Thymus präsentiert, die nicht a priori im Thymus vorkommen. Da einige Selbst- Antigene den Thymus nicht erreichen, können trotz der klonalen Deletion wenige autoreaktive Zellen zu funktionell aktiven, immunkompetenten T-Zellen heranreifen. Des Weiteren bestehen periphere Toleranz-Mechanismen, die dazu beitragen, die immunologische Homöostase aufrechtzuerhalten. Hierbei gibt es unterschiedliche Mechanismen der Kontrolle, wobei besonders den FoxP3-abhängigen $CD4^+CD25^+$ - T_{reg} Zellen eine zentrale Bedeutung zukommt (69-72).

Man unterscheidet bei der Kontrolle der peripheren T-Zellaktivierung zwischen intrinsischen und extrinsischen Mechanismen. Ein wichtiger intrinsischer Kontrollmechanismus besteht darin, dass naive T-Zellen co-stimulatorische Signale über den Rezeptor CD28 benötigen. Das bedeutet, dass eine TCR Stimulation ohne CD28 Co-Stimulation zur Induktion von Toleranz, Anergie oder Apoptose einer Zelle führt. Co-stimulatorische Moleküle befinden sich nur auf Antigenpräsentierenden Zellen wie die dendritischen Zellen und nicht auf jeder Körperzelle. Diese werden auch nur im aktivierten Zustand exprimiert. Kommt es zu einer starken TCR-Stimulation, kann dies zum Zelltod führen, da hierdurch eine überschießende Immunreaktion unterbunden und ein damit verbundener Kollateralschaden vermieden werden soll. Dendritische Zellen sind nicht nur für die Induktion einer effektiven Immunreaktion, sondern auch für die direkte Kontrolle der peripheren Toleranz verantwortlich. Wie schon oben erwähnt, exprimieren dendritische Zellen ihre co-stimulatorischen Moleküle nur nach Aktivierung. Dies geschieht z.Bsp. bei einer bakteriellen oder viralen Infektion. Im unreifen, nicht-aktivierten Zustand haben sie toleranzerhaltende Funktionen. Sie können dann T-Zellen mit regulatorischen Eigenschaften induzieren (73, 74). Andererseits können regulatorische T-Zellen ihrerseits die Ausreifung von dendritischen Zellen behindern und somit eine Immunantwort modulieren (75).

1.7 Regulatorische T-Zellen

Als charakteristisches Gen der regulatorischen T-Zellen hat sich der Transkriptionsfaktor FoxP3 herausgestellt (76, 77). Neben den natürlich vorkommenden regulatorischen CD4⁺CD25⁺ T_{reg} Zellen, die sich FoxP3 abhängig entwickeln, sind auch andere T-Zellen mit suppressiver Eigenschaft bekannt. Hierzu gehören z.Bsp. natürliche Killer T-Zellen oder CD8⁺CD28⁻ T-Zellen. Sie unterscheiden sich in ihrer Entwicklung, durch die Expression von FoxP3 und dem Mechanismus ihrer suppressiven Eigenschaften. T-Helfer Zellen (Th0), die zunächst noch keine Bestimmung haben, werden über IL-12 unter Einfluss des Transkriptionsfaktors T-bet zu Th1 Zellen, über IL-4 unter Einfluss des Transkriptionsfaktors GATA-3 zu Th2 Zellen und über IL-10 und Transkriptionsfaktor FoxP3 zu Treg differenziert (78). Die Aufgabe der regulatorischen T-Zellen besteht in der Verhinderung von Autoimmunität, Allergien und Transplantatabstoßung. Treg sind nicht nur einem einzigen Phänotyp zuzuordnen. Die CD4⁺ regulatorischen T-Zellen lassen sich in verschiedene Gruppen unterteilen. CD4⁺CD25⁺ und CD4⁺CD25⁻ zeigen beide regulatorische T-Zell Funktionen. Der Unterschied der Zellpopulationen liegt in der Verwendung unterschiedlicher Suppressormechanismen. Obwohl CD 25 Tregs in nativen Ag-nichtexprimierten Individuen markiert, ist der Marker nicht in der Lage Tregs mit CD4 T-Zellen klar in Ag-exprimierenden Individuen zu markieren. So findet man CD 25⁻ und CD 25⁺, die zu CD 25⁻ in vivo werden und ihre regulatorische Funktion verlieren, genau wie CD25⁺ Tregs, die sich von CD 25 Vorläuferzellen ableiten lassen.

Natürlich vorkommende regulatorische CD4⁺CD25⁺ T_{reg} Zellen haben sich als eine FoxP3 abhängige Subpopulation von Suppressor T-Zellen erwiesen. Fehlt FoxP3 kommt es somit zum Verlust von CD4⁺CD25⁺ T_{reg} Zellen, was zu einem letalen Immundefekt mit multiplen Autoimmunkrankheiten führt (79). Bei Menschen sind CD4⁺CD25⁺ T_{reg} Zellen durch eine starke Expression des Oberflächenmoleküls CD 25^{high} gekennzeichnet. Diese Population repräsentiert nur etwa 1-3 % der CD4⁺ T-Zellen (80). Neben der bekannten FoxP3 abhängigen Entwicklung im Thymus ist auch eine Konversion von peripheren CD4⁺CD25⁻ T-Zellen bekannt (81, 82). Die klinische Bedeutung einer veränderten Zahl von CD4⁺CD25⁺ T_{reg} Zellen wurde in unterschiedlichen Erkrankungen beschrieben. Diese sind z.Bsp. Tumorerkrankungen, Autoimmunerkrankungen wie Multiple Sklerose, Myasthenia

Gravis, Diabetes mellitus und in der Transplantation die *graft versus host* Erkrankung (73, 83-91).

Die antivirale Immunantwort bei DCMi ist unvollständig verstanden. Auf der Basis tierexperimenteller Befunde aus dem Coxsackie B Virus Mausmodell sowie präliminären Ergebnissen von DCMi Patienten wird davon ausgegangen, dass eine initiale stark ausgeprägte, Th1/CTLs (zytotoxische T-Zellen) polarisierte Immunantwort zu einer raschen Viruselimination und somit Ausheilung der kardialen Virusinfektion führt, hingegen eine suboptimale Th1/CTLs gestützte, bzw. Th2 gewichtete Immunantwort eine ineffektive Viruselimination fördert, und somit über die Viruspersistenz zu einem Progress der DCMi beiträgt. Die Rolle von regulatorischen T-Zellen (Tregs), die durch den Transkriptionsfaktor FoxP3 charakterisiert werden, ist bei der DCMi bislang nicht untersucht. Tregs könnten unter Einbeziehung der theoretischen Grundlagen und in Anlehnung an andere bereits in diesem Zusammenhang untersuchten Erkrankungen einerseits vor einer überschießenden, gewebsdestruierenden Immunantwort schützen, andererseits aber auch die effektive Viruselimination über die Hemmung der antiviralen Immunantwort fördern.

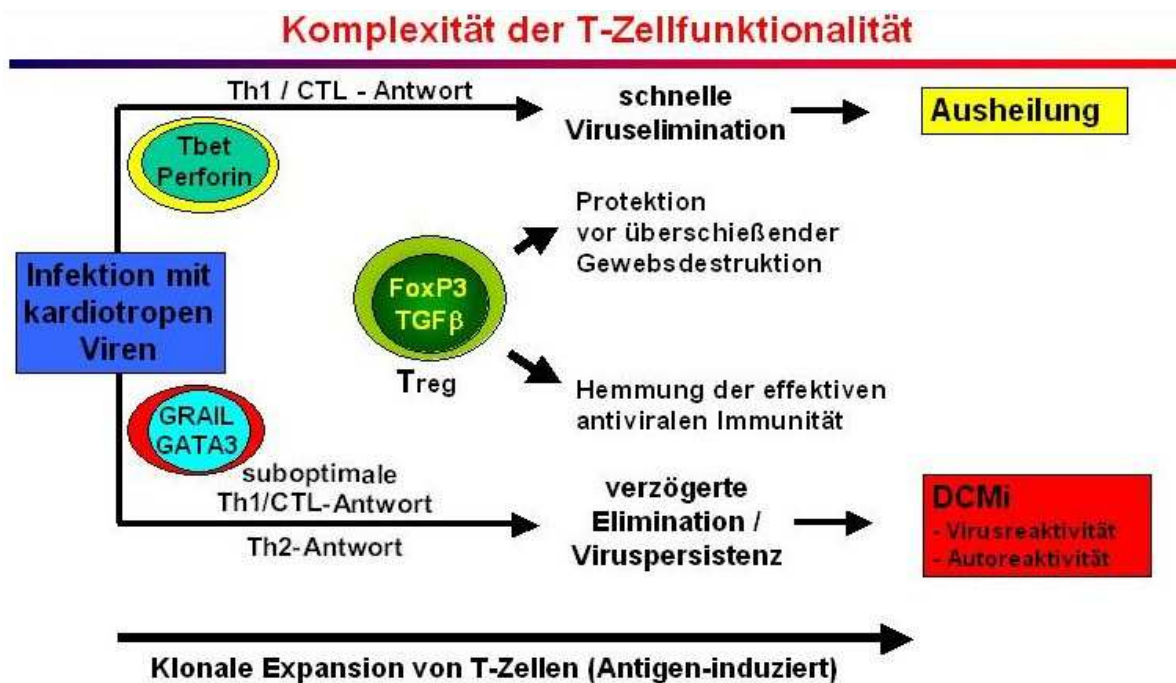


Abb.5: Modell für die mögliche Bedeutung von regulatorischen T-Zellen bei Virus-induzierter DCMi.

1.8 **Transkriptionsfaktor FoxP3**

Bereits in den 70er Jahren wurde die Existenz immunregulatorischer T-Zellen postuliert. Es gelang jedoch nicht, eine Population definitiv und reproduzierbar zu charakterisieren, die für die beobachteten immunregulatorischen Effekte verantwortlich gemacht werden konnte. Mitte der 90er Jahre konnte Sakaguchi et al. zeigen, dass eine Depletion von CD25 Zellen zur Entstehung von Autoimmunerkrankungen in Mäusen führt (92). Mittlerweile konnte für viele verschiedene T-Zellpopulationen eine regulatorische Potenz beschrieben werden. CD4⁺/CD25⁺ T-Zellen gelten als die besten charakterisierbaren regulatorischen T-Zellen. Bereits Anfang der 80er Jahre konnte gezeigt werden, dass Mäusen, den in den ersten 3 Lebenstagen der Thymus entfernt wurde, an einem schweren Polyautoimmunsyndrom (siehe unten) erkrankten. In einer weiteren Arbeit konnte diese Beobachtung dem Fehlen von CD4⁺/CD25⁺ Zellen in den thymektomierten Mäusen nachgewiesen zugeordnet werden, da sich durch Gabe von CD4⁺/CD25⁺ Zellen die Entstehung einer Polyautoimmunerkrankung bei früh thymektomierten Mäusen verhindern ließ.

Eine andere Studie von Viglietta et al zeigte, dass bei Patienten mit Multipler Sklerose eine deutlich schwächere inhibitorische Funktion der T-regulatorischen Zellen im Vergleich zu Gesunden aufgewiesen werden konnte (93).

Forkhead Proteine bilden eine eigenständige Familie von Transkriptionsfaktoren (Fox-Familie), die eine Vielzahl zellulärer Differenzierungsprozesse steuern (34). Die Bezeichnung *forkhead* leitet sich von dem Genprodukt fkh von *Drosophila melanogaster* ab. In den letzten 10 Jahren wurden mehr als 100 Mitglieder der *forkhead* Transkriptionsfaktor-Familie identifiziert. Die Kristallstruktur der DNA-bindenden *forkhead*-Domäne eines Fox-Proteins wurde als *winged helix* Struktur beschrieben. Es besteht eine große Sequenzhomologie zwischen FoxP3 bei Mensch, Maus und Ratte. Die Namensgebung beruht auf ihrer schmetterlingsartigen, zweiflügligen Erscheinung. Der Verlust der FoxP3-Funktion führt beim Menschen zum IPEX-Syndrom (Immun-Dysregulation-Polyendokrinopathie-X-chromosomale Enteropathie). Es ist eine seltene Erkrankung der Knaben mit Symptomen wie therapieresistente Durchfälle, ichthyosiforme Dermatitis, früh beginnender insulinabhängiger Diabetes mellitus, Thyreoiditis, hämolytische Anämie,

verschiedene Autoimmun-Phänomene und schweren Infektionen. Die *scurfy* Maus zeigt ein ähnlich starkes autoimmunes Syndrom. Auch hier wurde das verantwortliche Gen identifiziert: FoxP3/Scurfin (94).

1.9 Zielsetzungen der Arbeit

Im Rahmen der vorliegenden experimentellen Arbeit sollte(n)

1. Kenntnisse über die dilatative Kardiomyopathie und der akuten Myokarditis in Bezug auf regulatorische T-Zellen (Tregs), die durch Expression des Signaturmarkers FoxP3 charakterisiert und detektiert werden können, gewonnen werden
2. die Rolle von regulatorischen T-Zell Frequenzen bei Patienten mit der klinischen Präsentation einer AMC oder DCM im Vergleich zu gesunden Probanden und Patienten mit ischämischer Kardiomyopathie (ICM) bestimmt werden.
3. eine Möglichkeit zur Isolierung und Markierung von regulatorischen T-Zellen gefunden werden
und
4. Hinweise zur therapeutischen Relevanz von regulatorischen T-Zellen bei der dilatativen Kardiomyopathie und akuten Myokarditis eruiert werden.

2 Material und Methodik

2.1 Patienten und Kontrollen

Ziel der Arbeit war es die Frequenz von FoxP3⁺ Zellen bei Patienten mit der klinischen Präsentation einer AMC und DCM im Vergleich zu gesunden Probanden und Patienten mit ischämischer Kardiomyopathie (ICM) mittels FACS-Analyse zu bestimmen und zu vergleichen. Es wurden periphere mononukleäre Zellen (PBMCs) aus EDTA-Blut von Patienten mit klinischem V.a. AMC und DCM, sowie von gesunden Probanden als auch von Patienten mit ICM (Herzinsuffizienz mit einer nicht-DCM-Genese) als Kontroll-Population untersucht. Es wurden Blutproben von

- n=13 gesunden Probanden (Frauen: n=7 /53,85%; Alter: 39,9±9,96 Jahre);
- 7 ICM-Patienten (Frauen: n= 0 / 0%), Alter: 63,3±6,03 Jahre,
- 20 AMC-Patienten (Frauen: n= 1 /5,0%), Alter: 40,1±11,21 Jahre, und
- 36 DCM- Patienten (Frauen: n= 6 / 16,67%, Alter: 51,69±12,03 Jahre, entnommen.

Die Symptombdauer variierte zwischen 2,00±2,11 Monaten bei den AMC-Patienten, 12,1±15,14 Monaten bei den ICM-Patienten und 19,82±40,31 Monaten bei den DCM-Patienten. Aus ethischen Gründen konnten EMBs-Untersuchungen nur an AMC- und DCM-Patienten vorgenommen werden, weil hierbei die EMBs-Diagnostik eine klinische Routineprozedur darstellt. Alle AMC- und DCM-Patienten willigten in diese Untersuchungen schriftlich ein. Diese Untersuchung wurde von der Ethikkommission der Charité-Universitätsmedizin Berlin im Rahmen des Sonderforschungsbereichs SFB TR19, „Inflammatorische Kardiomyopathie – Molekulare Pathogenese und Therapie“ bewilligt.

Die Analyse von kardiotropen Virusgenomen mittels nPCR und der intramyokardialen Entzündung mittels immunhistologischer Markierung und Quantifizierung unter Verwendung der digitalen Bildanalyse (DBA) im Sinne einer DCMi aus EMBs auf dem rechtsventrikulären Septum erfolgte nach publizierten Methoden.

Weiterhin wurden Daten über LVEF, Erkrankungsbeginn, Symptombdauer, Fiebersymptomatik, Infarkt-ähnliche Präsentationen, CK Peak, CK- MB Peak, Troponin, Angina Pectoris Symptomatik in Ruhe und Belastung, NYHA- Stadien, Dyspnoe in Ruhe und Belastung, Leistungsknick, kardiale Dekompensationen, pulmonale und periphere Ödeme, Reanimation, Palpitationen, Herzrasen, Schwindel,

Synkopen, Hypertonie, familiäre Krankheitsgeschichte, Rauchverhalten, Alkoholkonsum, Diabetes mellitus, LV-Thrombus, Perikarderguss, Septum (mm), Posteriore Wand (mm), LA (mm), LVEDD (mm), LVESD (mm), FS (%), Mitral-Segel-Septum-Abstand (mm), LVEDP (mmHg), Mitralinsuffizienz, Mitralinsuffizienz-Grad, EKG, Rhythmus, Vorhofflimmern, ST-Hebungen, T-Negativierung, LSB, RSB und AV-Block mittels Patientenakten und Echobefunden erhoben.

2.2 PBMCs

2.2.1 Präparation von PBMCs aus dem Blut

Aus den 3ml EDTA- Röhrcchen wurde das Blut in 50ml Röhrcchen überführt und mittels Dulbecco's PBS ohne Calcium und Magnesium (PAA Laboratories GmbH, Pasching) bis auf ein Endvolumen von 16ml aufgefüllt. Zur Isolierung der Lymphozyten wurden jeweils 3 ml Ficoll (Lymphozyten Separations-Medium, PAA Laboratories GmbH, Pasching) in zwei mal 12 ml Röhrcchen vorgelegt und mit ca. 8ml verdünntem Blut überschichtet. Anschließend zentrifugierten die Röhrcchen 35 Minuten bei 1400rpm und 20° Celsius ohne Bremse (Zentrifuge von Heraeus Instruments, Megafuge 1.OR). Dann konnte das Plasma bis 2 cm über dem Lymphozytenring abgesaugt, der Lymphozytenring mit Pasteurpipette oder 5 ml serologischer Pipette entnommen, in 15 ml Röhrcchen gesammelt und mittels PBS dreimal gewaschen werden. Abschließend wurde eine erneute Zentrifugation für 15 Minuten bei 1200rpm und 4° Celsius durchgeführt. Die Zellen waren dann zum Einfrieren bereit.

2.2.2 Einfrieren von Zellen

Das Zellpellet wurde zum vitalen Einfrieren der Zellen in 2ml Einfriermedium aufgenommen und in zwei Kryo-Röhrcchen á 1ml Zellsuspension aliquotiert. Das Einfriermedium bestand aus 90% FCS (Fetal Bovine Serum Gold, PAA Laboratories GmbH, Pasching) und 10% DMSO (Dimethyl Sulphoxide Hybri- Max, Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Steinheim). Die Röhrcchen konnten dann zum Einfrieren in den

Nalgene Cryo Container (Nalge Nunc International, Herford, U.K.) gegeben und in den -80° Celsius Kühlschrank gestellt werden.

2.2.3 Auftauen von Zellen

Das Auftauen der Zellsuspension eines Kryo-Röhrchens im 37°C Wasserbad sollte möglichst schnell erfolgen, anschließend wurde die Zellsuspension in ein 15 ml Röhrchen gegeben, das Kryo-Röhrchen mit 1 ml kaltem RPMI-Medium (RPMI 1640, PAA Laboratories GmbH, Pasching) gespült und die Spüllösung ebenfalls in das 15 mL Röhrchen überführt. Nun erfolgte das langsame Ausverdünnen des DMSO, indem das Volumen jede Minute verdoppelt und die Suspension durch vorsichtiges Schwenken durchmischt wurde. Abschließend erfolgte die Zentrifugation (1200rpm, 10 min, 4°C) und die Zellzählung der Zellen.

2.2.4 Vergleich von frischen und aufgetauten PBMCs

Da der zeitliche Aufwand der Messungen sehr groß war und nicht immer gewährleistet werden konnte, dass die Blutentnahmen am frühen Morgen stattfinden konnten, wurde bereits vorab der Unterschied zwischen frisch präparierten und eingefrorenen PBMCs getestet. Es ließ sich feststellen, dass es keinen signifikanten Unterschied zwischen frisch präparierten und eingefrorenen PBMCs für die FACS-Messung gab. Daher wurde in allen Probanden- und Patientenmessungen eingefrorene PBMCs verwendet.

2.3 FACS-Analyse

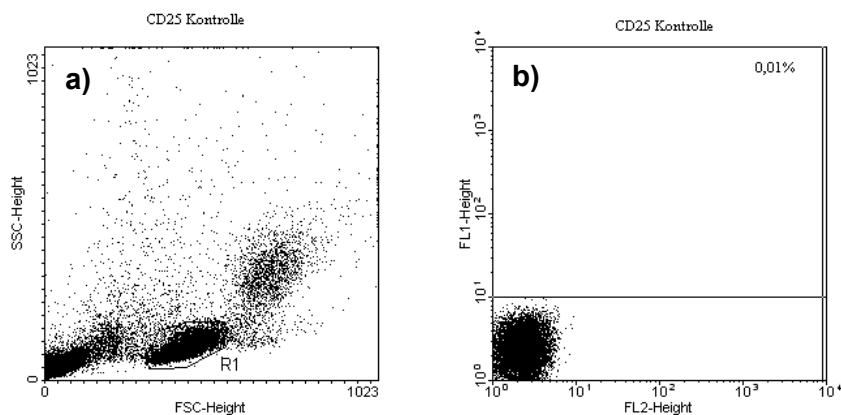
2.3.1 Antikörper

Die folgenden Antikörper wurden für die FACS- Analysen verwendet:

- Anti human Mouse CD 3 APC (BD Bioscience, Klon UCHT 1, San Diego, USA)
- Anti human Mouse CD 25 FITC (BD Bioscience, Klon M-A251, San Diego, USA)
- Anti human Mouse CD 4 PE- Cy5 (Beckman Coulter, Klon 13B8.2, Marseille, Frankreich)
- Anti human Ratte Foxp3 PE (eBioscience, Klon PCH 101, Frankfurt am Main, Deutschland)

2.3.2 Testung von Anti-CD25-Antikörpern

Um den optimalen CD25 Antikörper für die Foxp3-Messung zu finden, wurden mittels FACS-Analyse 2 unterschiedliche Klone unterschiedlicher Hersteller (Klon BC 96 von eBioscience; und Klon M-A251 von BD Bioscience, San Diego, USA) ausgetestet. In der FACS-Analyse wurden die Lymphozyten umrahmt (*gating*) und der Marker anhand der Isotypenkontrolle gesetzt (Siehe Abbildung 6 a-d).



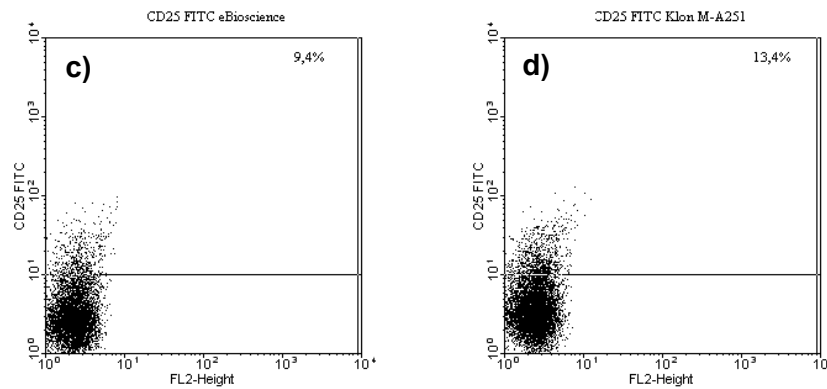


Abb. 6: FACS-Analyse von CD25⁺ T-Zellen mit 2 unterschiedlichen Antikörpern und Isotypenkontrolle

- Gating (Umrahmung) der T- Lymphozyten in der Facs Analyse
- Markersetzung mittels Isotypenkontrolle
- CD 25 FITC Klon BC 96 der Firma eBioscience (Expression von 9,4% CD25+ T-Lymphozyten)
- CD 25 FITC Klon M-A251 von BD Bioscience (Expression von 13,4% CD25+ T-Lymphozyten)

In den folgenden Untersuchungen fand dann der CD 25 FITC Klon M-A251 von BD Bioscience aufgrund seiner höheren Expression von CD25⁺ T-Lymphozyten Verwendung.

2.3.3 FACS-Durchflusszytometrie

Die Methode der Durchflusszytometrie (FACS: *fluorescence activated cell sorting*; fluoreszenzaktivierter Zellsorter) erlaubt es, Zellen, welche vorher mit Fluorochrom-Antikörperkonjugaten markiert worden sind, auf Einzelzellebene zu analysieren und zu sortieren. Die markierten Zellen werden durch eine Kapillare gedrückt, so dass ein Strom einzelner Zellen entsteht, der durch zwei Laser, einen Argon Laserstrahl (488 nm) und einen Diodenlaser (635 nm) erfasst wird. Hierdurch werden zum einen Fluorochrome zur Emission von Fluoreszenzlicht angeregt, zum anderen streuen die Zellen das auftreffende Licht. Das in einem geringen Winkel von 3°- 10° gestreute Licht wird als Vorwärtsstreulicht (*forward scatter/FSC*) bezeichnet und korreliert mit der Größe der Zelle. Das 90° gestreute Licht wird als Seitwärtsstreulicht (*sideward scatter/SSC*) genannt und korreliert mit der Granularität der Zelle. Gleichzeitig wird parallel durch vier verschiedene Fotodetektoren gemessen, ob die Zelle mit

fluoreszierenden Molekülen markiert ist und aufgrund der Anregung durch den Argonlaser bzw. Diodenlaser Licht emittiert.

Die in dieser Arbeit durchgeführten zytometrischen Messungen wurden mit einem FACS-Calibur™ (Becton Dickinson, Heidelberg, BRD) durchgeführt. Für die Messung der Fluoreszenzen standen vier Kanäle FL-1 (530 nm), FL-2 (585 nm), FL-3 (670 nm) und FL-4 (661 nm) zur Verfügung. Es wurden regelhaft 10.000 bis 100.000 Zellen im FSC-/SSC-Analysefenster aufgenommen, und die erste Auswertung erfolgte mit der Cellquest™ Software (BD Bioscience).

2.3.4 Markierungen von Antigenen

Nachdem das Auftauen der Zellen stattfand (mit RPMI, s.o.) und die Zentrifugation (1500rpm, 8 min, 4 °C) beendet war, erfolgte eine Aufnahme in 3 ml PBS und anschließender Zentrifugation (1500rpm, 8 min, 4 °C). Um die unspezifischen Bindungen zu blockieren, wurden die Zellen in PBS und Beriglobin 1:50 (Behring AG, Marburg, BRD) aufgenommen und 50 µl in FACS Röhrrchen gegeben. Abbildung 7 zeigt den Unterschied zwischen Bindungsblockierung mit und ohne Beriglobin. Mit Beriglobin konnten die unspezifischen Bindungen nachweislich gesenkt werden, welches deutlich an den Y-Mean-Werten der Kontrollen abgelesen werden kann.

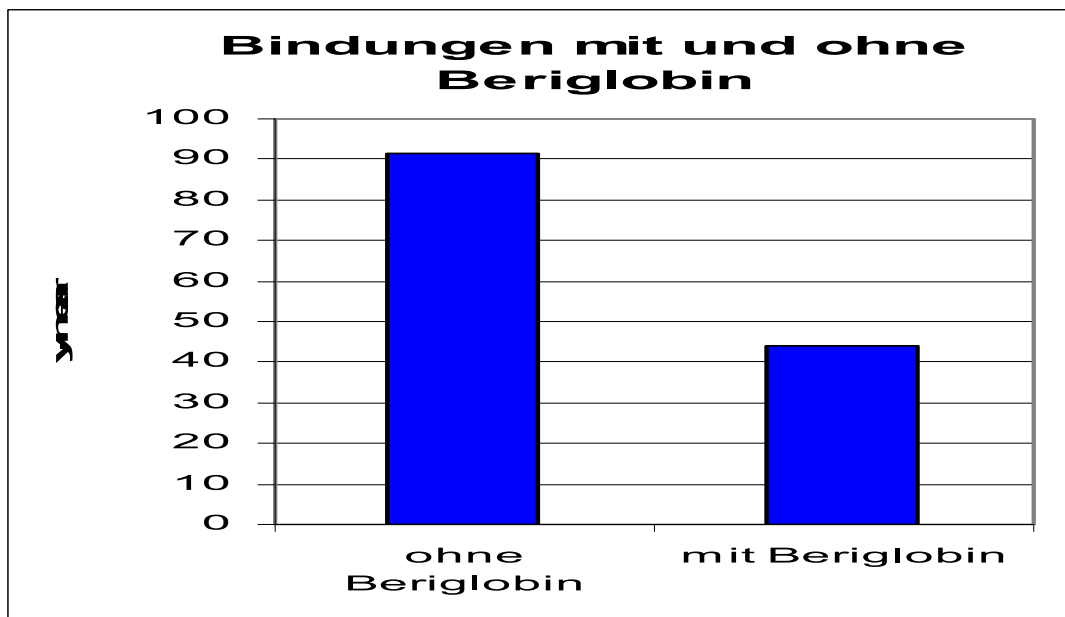


Abb. 7: Blockierung unspezifischer Bindungen mit und ohne Beriglobin

Nach FACS-Antikörperzugabe, bis auf FoxP3, folgte dann nach gutem Mischen die Inkubation (15 min im Dunkeln bei Raumtemperatur). Anschließend wurden 2 ml PBS zu jedem Röhrchen zugefügt und erneut zentrifugiert (1500 rpm, 8 min, 4 °C). Nach Dekantierung des Überstandes, erfolgte die Aufnahme der Zellen in die *working solution*. Desweiteren wurde eine Inkubation von 30- 60 Minuten im Dunkeln durchgeführt. Nach der Inkubation wurden 2 ml PBS zu jedem Röhrchen gegeben und zentrifugiert (1500 rpm, 8 min, 4 °C) und anschließend der Überstand wieder dekantiert. Nun konnten die Zellen zweimal mit 1ml Permeabilisierungspuffer gewaschen (Zentrifugationsbedingungen: 1500 rpm, 8 min, 4 °C) und anschließend der Überstand erneut dekantiert werden. Die nächsten Färbeschritte waren nicht für alle Röhrchen gleich, da es sich bei der Färbung mit FoxP3 um eine intrazelluläre Färbung handelte, die anderen Antikörper jedoch extrazellulär angefärbt wurden. Die FoxP3-Röhrchen wurden mit 50 µl Rattenserum zum Blocken der unspezifischen Bindungen behandelt und für 15 min bei 4 °C inkubiert. Es erfolgte die Zugabe von 10µL FoxP3-PE und eine 30minütige Inkubation bei 4 °C. Anschließend erfolgte die zweimalige Waschung mit je 1ml Permeabilisierungspuffer (Zentrifugationsbedingungen:1500rpm, 8 min, 4 °C). Die Zellen wurden erneut in 2ml PBS aufgenommen und zentrifugiert (1500rpm, 8 min, 4 °C) und mit 300µl PBS

aufgefüllt. Eine Aufbewahrung bis zur Messung fand im Dunkeln bei 4°C statt. Die Zellen der Einstellungsröhrchen wurden in 2ml PBS aufgenommen und zentrifugiert (1500rpm, 8 min, 4 °C) und dann mit 300µl PBS aufgefüllt.

2.3.5 Präparationen der Färbepuffer

Die intrazelluläre FoxP3 Markierung wurde nach den Vorschriften des Herstellers eBioscience durchgeführt. Für die Fixierung und Permeabilisierung konnten die von der Firma zur Verfügung gestellten Puffer genutzt werden. Der FoxP3 Antikörper wurde in einer Menge von 10 µl eingesetzt.

2.4 Statistische Auswertung

Die statistische Analyse erfolgte unter Einsatz der Statistiksoftware JMP 4.0.2 (SAS Institute Inc, Cary, NC, USA). Ein p Wert von $\leq 0,05$ wurde als statistisch signifikant eingestuft. Bei Ausschluss einer Gaus'schen Normalverteilung mit dem Shapiro-Wilk W Test ($p < 0,05$) wurden ausschließlich nicht- parametrische Test angewandt. Werte der Patientengruppe, die die 90%ige Perzentile der Kontrollgruppe überschritten, wurden als signifikant bzw. pathologisch erhöht klassifiziert. Ordinal- bzw. Nominaldaten zweier Gruppen wurden mittels χ^2 Test verglichen und kontinuierliche Daten mit Ordinaldaten mittels Wilcoxon/Kruskal- Wallis-Test mit Tukey-Kramer post-hoc Analyse zur Ermittlung der *honestly significant difference* bei Vergleichen von >2 Gruppen verglichen (21). Diese Analyse wird graphisch durch Quintilen-Boxplots mit den verglichenen Gruppen zuzuordnenden Kreisen illustriert. In diesen Boxplots wird der Gesamtmittelwert der untersuchten Daten (*grand mean*) fakultativ durch den gesamten Boxplot durchquerenden horizontalen Linie angezeigt. Die Mediane mit dem 25.-75. Perzentilen-Bereich sind oberhalb der entsprechenden Gruppen angegeben. Die in den Tabellen und Säulendiagrammen gezeigten Streuungen werden in SD- Werten angegeben.

3 Ergebnisse

3.1 Patientengruppen

Es wurden periphere mononukleäre Zellen (PBMCs) aus EDTA-Blut von Patienten mit klinischem V.a. AMC und DCM, als auch von gesunden Probanden sowie von Patienten mit ICM (Herzinsuffizienz nicht-DCM-Genese) als Kontroll-Population (Tabelle 1) untersucht. Aus ethischen Gründen konnten EMBs-Untersuchungen nur an AMC und DCM Patienten vorgenommen werden, weil hierbei die EMBs-Diagnostik eine klinische Routine darstellt. Alle AMC- und DCM-Patienten willigten in diese Untersuchungen schriftlich ein (Ethikprotokoll des SFB TR19; bewilligt durch die Ethikkommission der Charité).

Tabelle 1: Anzahl, Geschlecht und Alter von Probanden und Patienten

	Probanden	ICM	AMC	DCM
Anzahl (n)	13	7	20	36
Geschlecht (m/w)	6/7	7/0	19/1	30/6
Alter (Jahre)	39,9 \pm 9,96	63,3 \pm 6,03	40,1 \pm 11,21	51,69 \pm 12,03

Die akute Myokarditis wurde unter klinischen Gesichtspunkten noch einmal in AMC-AMI und AMC-DLVF unterteilt. Es wurden 5 Patienten mit AMC-AMI und 15 Patienten mit AMC-DLVF untersucht. Hierunter befanden sich 19 Männer. Nur eine Frau mit AMC-DLVF konnte untersucht werden. Die Patienten mit AMC-AMI waren mit 32,27 \pm 11,32 Jahren jünger als die der AMC-DLVF (43,71 \pm 9,50 Jahre).

3.2 Symptome und Symptomdauer

Ein spezifisches Symptom der akuten Myokarditis existiert nicht. Sie kann vollkommen asymptomatisch auftreten, aber auch mit Belastungsintoleranz, atypische Angina pectoris bis hin zu Herzinfarkt- ähnlichen Präsentationen oder diversen Herzrhythmusstörungen wie Extrasystolie, AV- Block, Schenkelblock, Vorhofflimmern und ventrikuläre Tachykardien einhergehen. Häufig existiert eine

zeitliche Assoziation zu einem Infekt des respiratorischen und/oder gastrointestinalen Traktes. Die Krankheitsdauer der einzelnen Myokarditiden zeigte einen signifikanten Unterschied. Während die AMC- AMI Patienten eine Krankheitsdauer von $0,85 \pm 0,90$ Monaten und die AMC- DLVF von $2,38 \pm 2,28$ Monate ($p=0,046$) aufwiesen, zeigte sich ein deutlich längerer Verlauf bei den Patienten der ICM ($12,1 \pm 15,14$) und DCM ($19,82 \pm 40,31$). 4 Patienten (80%) mit AMC-AMI und 11 Patienten (73,11%) mit AMC-DLVF wiesen einen grippalen Infekt mit Fiebersymptomatik auf, während es bei den DCM- Patienten nur 4 (11,11%) waren. Der zeitliche Verlauf von Symptombeginn bis zur detaillierten Diagnostik, an hierfür spezialisierten Zentren, war ebenfalls sehr unterschiedlich. Während es bei der AMC-AMI $2,57 \pm 3,27$ Monate bzw. bei der AMC-DLVF $2,76 \pm 1,96$ Monate waren, wurde die DCM hochsignifikant ($p < 0,0001$) später diagnostiziert ($9,60 \pm 1,07$ Monate).

3.2.1 Anamnestische Parameter

Tabelle 2: Gegenüberstellung der anamnestischen Parameter von gesunden Kontrollen, ICM, AMC-AMI, AMC-DLVF und DCM.

	Gesunde Kontrolle n	ICM	AMC-AMI	AMC-DLVF	DCM	P
Infarktähnliche Präsentation	n=0 (0%)	n=0 (0%)	n=5 (100%)	n=8 (53,33%)	n=0 (0%)	<0,0001*
AP-Ruhe	n=0 (0%)	n=1 (14,29%)	n=5 (100%)	n=1 (6,67%)	n=7 (19,44%)	<0,0001*
AP- Belastung	n=0 (0%)	n=1 (14,29%)	n=2 (40%)	n=3 (20%)	n=6 (16,67%)	0,3004
Dyspnoe-Ruhe	n=0 (0%)	n=2 (28,57%)	n=0 (0%)	n=8 (53,33%)	n=9 (25%)	0,0142*
Dyspnoe-Belastung	n=0 (0%)	n=4 (57,14%)	n=1 (20%)	n=14 (93,33%)	n= 29 (80,56%)	<0,0001*
Leistungsknick	n=0 (0%)	n=3 (42,86%)	n=1 (20%)	n=11 (73,33%)	n=12 (33,33%)	0,0017*
Kardiale Dekompensation	n=0 (0%)	n=2 (28,57%)	n=0 (0%)	n=8 (53,33%)	n=12 (33,33%)	0,0173*
Pulmonale Ödeme	n=0 (0%)	n=0 (0%)	n=0 (0%)	n=2 (13,33%)	n=4 (11,11%)	0,5004

Periphere Ödeme	n=0 (0%)	n=2 (28,57%)	n=0 (0%)	n=7 (46,67%)	n=5 (13,89%)	0,0113*
Palpitationen	n=0 (0%)	n=0 (0%)	n=0 (0%)	n=3 (20%)	n=5 (13,89%)	0,3061
Herzrasen	n=0 (0%)	n=0 (0%)	n=0 (0%)	n=1 (6,67%)	n=7 (19,44%)	0,1834
Schwindel	n=0 (0%)	n=0 (0%)	n=0 (0%)	n=2 (13,33%)	n=3 (8,33%)	0,5488
Synkopen	n=0 (0%)	n=0 (0%)	n=1 (20%)	n=0 (0%)	n=4 (11,11%)	0,2739
Hypertonie	n=1 (7,69%)	n=7 (100%)	n=0 (0%)	n=4 (26,67%)	n=14 (38,89%)	0,0003*

Tabelle 2 zeigt signifikante Unterschiede in der infarktähnlichen Präsentation, AP-Ruhe, Dyspnoe- Belastung, Leistungsknick, kardiale Dekompensation, periphere Ödeme und Hypertonie. Die anderen anamnestisch erhobenen Daten zeigen keine signifikanten Unterschiede innerhalb der unterschiedlichen Patientengruppen. Neben den kardialen Symptomen wurden auch Daten zum Alkoholkonsum, Rauchverhalten und anderen Stoffwechselerkrankungen wie Diabetes mellitus erhoben. Hierbei zeigte sich ein deutlicher Unterschied ($p = 0,0005$) beim Diabetes mellitus. Während 4 (57,14%) ICM-Patienten und 4 (11,11%) DCM-Patienten an Diabetes mellitus litten, war keiner der AMC-Patienten oder gesunden Kontrollen erkrankt. Die Raucher waren etwa gleich häufig verteilt. So rauchten 3 (23,08%) der gesunden Probanden, 1(14,29%) ICM-Patient, 7 (35%) AMC- Patienten und 9 (25%) der DCM-Patienten. Einen auffälligen Unterschied gab es nicht. Auch beim Alkoholkonsum gab es keine signifikanten Zusammenhänge. Bei keinem der eingeschlossenen Patientinnen oder Patienten war ein überhöhter Alkoholkonsum erfragbar, der in Bezug auf die tägliche Dosis mit der Entstehung der Kardiomyopathie in Zusammenhang stehen könnte (25).

3.3 Laborwerte

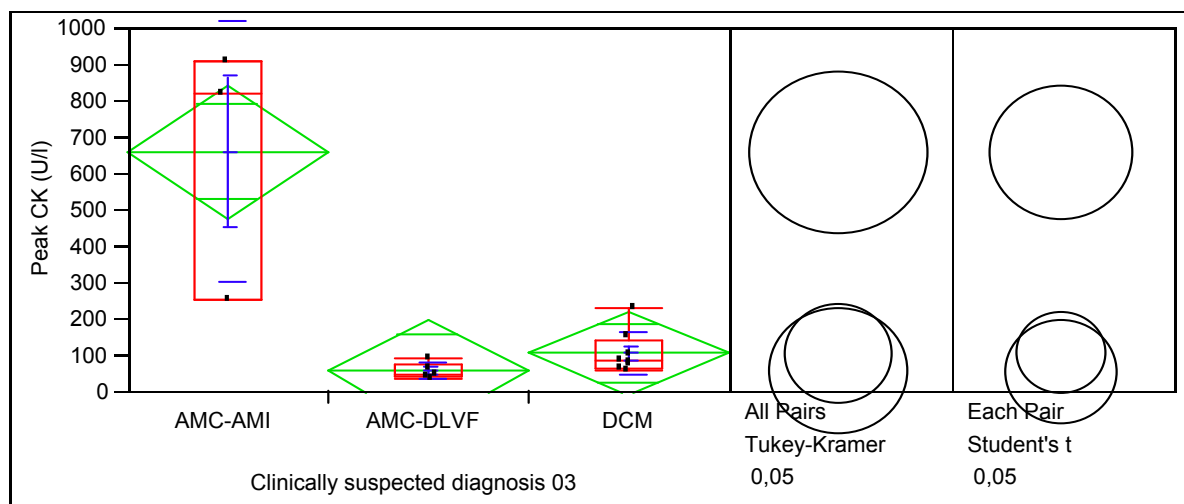
Die Schädigung des Herzens, z.Bsp. durch einen Herzinfarkt oder eine Herzentzündung führt zu einer Schädigung der Herzmuskelzellen. Troponin T und

Creatininkinase MB werden bei einer Schädigung der Herzmuskelzellen in den Blutkreislauf freigesetzt und können in einer Blutprobe nachgewiesen werden.

Die Creatininkinase ist ein wichtiges Enzym für die Diagnose bei Herz- und Skelettmuskelschädigungen. Die Höhe des CK- Anstiegs und die Infarktgröße korrelieren miteinander. Die Gesamt- CK ist die Summe der vier Isoenzyme CK- MM (Skelettmuskeltyp), CK-BB (Hirntyp), CK-MB (Myokardtyp) und CK-MiMi (Mitochondrientyp). Der CK-Normalbereich liegt bei Männern zwischen 10-80 U/l und bei Frauen bei 10-70 U/l. Abbildung 8 zeigt die signifikanten (AMC-AMI– AMC-DLVF: $p = 0,00028$; AMC-AMI – DCM: $p = 0,00039$) Unterschiede der CK- Werte in den unterschiedlichen Patientengruppen.

Abb. 8: CK- Werte in U/l der einzelnen Patientengruppen

AMC-AMI	AMC-DLVF	DCM
660,00+355,40	56,50+21,08	106,62+58,45



Legende: Die X- Achse zeigt die unterschiedlichen Patientengruppen, die Y-Achse die CK- Werte der unterschiedlichen Gruppen. Es konnte eine deutliche Erhöhung der CK bei der Gruppe der AMC-AMI Patienten verzeichnet werden. (AMC-AMI– AMC-DLVF: $p = 0,00028$; AMC-AMI – DCM: $p = 0,00039$).

Da die CK nicht zwischen Herz und anderen Muskelzerstörungen unterscheiden kann, wird immer häufiger Troponin zur Herzinfarkt- Diagnostik verwendet.

Troponin T ist ein herzmuskelspezifisches Eiweiß, d.h. es zeigt in aller Regel eine spezifische Herzmuskelschädigung an. Der Normalbereich liegt bei Männern als auch bei Frauen unter 0,1ng/ml. Gesunde Probanden und Patienten mit ICM wiesen keinen erhöhten Troponin T Wert auf. Die AMC-AMI Patienten zeigten zu 100% einen Troponin Anstieg ($p < 0,0001$), was nicht weiter verwunderlich ist, weil dieses Merkmal per definitionem zur AMC-AMI gehört. Keiner der AMC-DLVF und DCM Patienten ($n = 0$) wiesen einen erhöhten Troponinspiegel auf.

3.4 Stadieneinteilung nach NYHA

Die NYHA-Klassifikation ist ein ursprünglich von der *New York Heart Association* veröffentlichtes Schema zur subjektiven Einteilung der Herzinsuffizienz-Symptomatik. Am häufigsten wird sie zur Einteilung der Herzinsuffizienz in verschiedene Stadien entsprechend der Leistungsfähigkeit des Patienten verwendet. Die NYHA-Klassifikation liefert keinen Hinweis auf die Ursache der kardialen Störung. Die zur Beurteilung der Stadien herangezogenen Symptome beinhalten Atemnot (Dyspnoe), häufiges nächtliches Wasserlassen (Nykturie), Zyanose, allgemeine Schwäche und Müdigkeit, Angina Pectoris oder kalte Extremitäten. Die NYHA teilt die Herzinsuffizienz in vier Schweregrade ein:

- NYHA 1: Keine Beschwerden
- NYHA 2: Keine Beschwerden bei normaler täglicher körperlicher Belastung. Bei höheren Belastungen kommt es zu leichten bis mittleren Beschwerden
- NYHA 3: Bei alltäglichen durchschnittlichen Belastungen kommt es zu Beschwerden. Nur in Ruhe treten diese nicht auf. Die Leistungsfähigkeit ist deutlich eingeschränkt.
- NYHA 4: (Ruhebeschwerden, deutlich zunehmende körperliche Belastung mit schwerer Einschränkung der körperlichen Leistungsfähigkeit).

Tabelle 3 zeigt die Einteilung der Probanden und Patienten nach der NYHA.

Tabelle 3: Einteilung der Herzinsuffizienz-Symptomatik nach der NYHA-Klassifikation

NYHA	0	1	2	3	4
Healthy Controls	13 (100%)	0	0	0	0
ICM	n=0	n=0	n=3 (42,86%)	n=4 (57,14%)	n=0
AMC-AMI	n=1 (20%)	n=0	n=4 (80,00%)	n=0	n=0
AMC-DLVF	n=0	n=0	n=7 (46,67%)	n=6 (40,00%)	n=2 (13,33%)
DCM	n=0	n=2 (5,56%)	n=23 (63,89%)	n=11 (30,56%)	n=0

3.5 EKG Veränderungen

Bei jedem Herzschlag entsteht im Herzen ein schwacher Strom mit einer Spannung von 1/1000Volt. Bei der Elektrokardiographie (EKG) werden diese elektrischen Aktivitäten des Herzens abgeleitet und in Form von Kurven aufgezeichnet.

Ein normales EKG fand sich bei 2 (28,57%) ICM-Patienten, 2 (40%) AMC-AMI-Patienten, 8 (53,33%) der AMC-DLVF-Patienten und bei 14 (38,89%) der DCM-Patienten. Ein Sinusrhythmus zeigte sich bei allen ICM- und AMC-AMI-Patienten sowie bei 13 (86,67%) der AMC-DLVF- und 29 (80,56%) der DCM-Patienten.

Vorhofflimmern als häufigste Herzrhythmusstörung infolge einer heterotopen Erregungsrückbildungsstörung mit ungeordneten hochfrequenten Vorhofaktionen (350-600/min) ohne hämodynamisch wirksame Vorhofkontraktionen, die bei unregelmäßiger AV-Überleitung zu absoluter Arrhythmie der Kammeraktion führt, konnten bei 1 (6,67%) der AMC-DLVF-Patienten und bei 5 (13,89%) der DCM-Patienten nachgewiesen werden. Eine Signifikanz ($p=0,0027$) zeigte sich bei den ST-Hebungen bei 3 (60%) AMC-AMI-Patienten, 2 (13,33%) der AMC-DLVF Patienten und bei 2 (5,56%) der DCM Patienten. Keine signifikanten Zusammenhänge konnten bei den T-Negativierungen festgestellt werden. Während jeweils 1 ICM-Patient (14,29%) und ein AMC-AMI-Patient (20%) T-Negativierungen aufwiesen, waren es 6 (40%) der AMC-DLVF und 16 (44,44%) der DCM-Patienten.

Ein Linksschenkelblock (LSB), als Form der intraventrikulären Erregungsleitungsstörung mit Blockierungen im linken Tawara-Schenkel oder weiter distal in beiden Faszikeln des linken Tawara-Schenkels (sog. bifaszikulärer Linksschenkelblock) konnte bei einem ICM- (14,29%) und 8 (22,22%) der DCM-Patienten belegt werden. Kein AMC-Patient wies einen Linksschenkelblock auf.

Ein Rechtsschenkelblock (RSB) zeigte sich bei 2 (13,33%) Patienten mit AMC-DLVF und 2 (5,56%) mit DCM.

Ein atrioventrikulärer Block (AV-Block) infolge einer Erregungsleitungsstörung zwischen Vorhof und Kammer des Herzens fand sich lediglich bei 3 (8,33%) der DCM-Patienten. Alle anderen wiesen keine AV- Blöcke auf. Tabelle 4 zeigt eine Zusammenfassung der EKG- Parameter.

Tabelle 4: EKG-Parameter bei ICM-, AMC-AMI-, AMC-DLVF- und DCM-Patienten

	ICM	AMC-AMI	AMC-DLVF	DCM
EKG normal	n= 2 (28,57%)	n= 2 (40%)	n= 8 (53,33%)	n= 14 (38,89%)
Sinusrhythmus	n= 7 (100%)	n= 5 (100%)	n= 13 (86,67%)	n= 29 (80,56%)
Vorhofflimmern	n= 0 (0%)	n= 0 (0%)	n=1 (6,67%)	n=5 (13,89%)
ST- Hebung	n= 0 (0%)	n= 3 (60%)	n= 2 (13,33%)	n= 2 (5,56%)
T- Negativierung	n= 1 (14,29%)	n= 1 (20%)	n= 6 (40%)	n= 16 (44,44%)
LSB	n= 1 (14,29%)	n= 0 (0%)	n= 0 (0%)	n= 8 (22,22%)
RSB	n= 0 (0%)	n= 0 (0%)	n= 2 (13,33%)	n= 2 (5,56%)
AV- Block	n= 0 (0%)	n= 0 (0%)	n= 0 (0%)	n= 3 (8,33%)

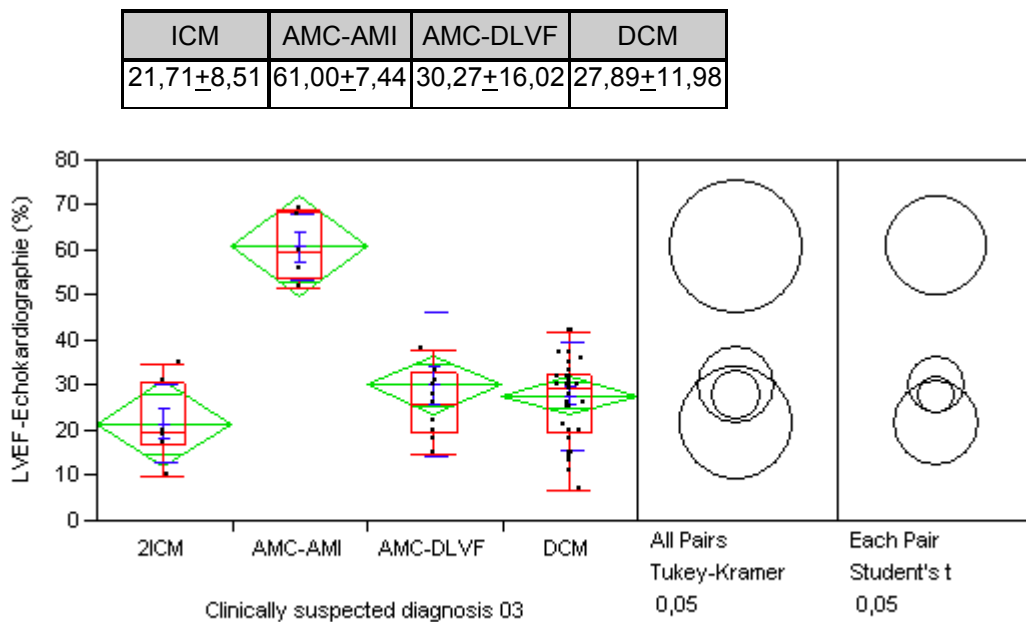
3.6 Echokardiografie

Neben dem EKG ist die Echokardiografie eine der wichtigsten technischen nichtinvasiven kardiologischen Untersuchungsmethoden. Die Größe der einzelnen Herzkammern, die globale und regionale (Wandbewegungsstörungen) Pumpfunktion insbesondere des linken Ventrikels, und die Funktion der einzelnen Herzklappen sind gut erkennbar. Auch Herzfehler können sicher erkannt werden.

3.6.1 Linksventrikuläre Ejektionsfraktion (LVEF)

Die linksventrikuläre Ejektionsfraktion (LVEF) ist die „Austreibungsfraktion“, welche das tatsächliche Herzauswurfleistung definierende Verhältnis zwischen Schlagvolumen und enddiastolischem Volumen misst. Der Normalwert liegt bei $\geq 65\%$ und ist bei Herzinsuffizienz, z.B. durch einen Myokardinfarkt oder eine Kardiomyopathie trotz erhöhtem Füllungsvolumen vermindert. Insbesondere die Viruspersistenz ist mit einer progredienten Einschränkung der linksventrikulären Ejektionsfraktion (LVEF) assoziiert. Abbildung 9 zeigt die LVEF in % der Probanden und Patienten.

Abbildung 9: Linksventrikuläre Ejektionsfraktion (LVEF) der einzelnen Gruppen



Legende: Die X- Achse zeigt die unterschiedlichen Patientengruppen, die Y-Achse die linksventrikulären Ejektionsfraktion .Es zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen der Gruppe der AMC-AMI Patienten und allen anderen Gruppen (AMC-AMI– AMC-DLVF: $p = 0,0000135$; AMC-AMI – ICM: $p = 0,0000015$; AMC-AMI – ICM: $p = 0,0000007$).

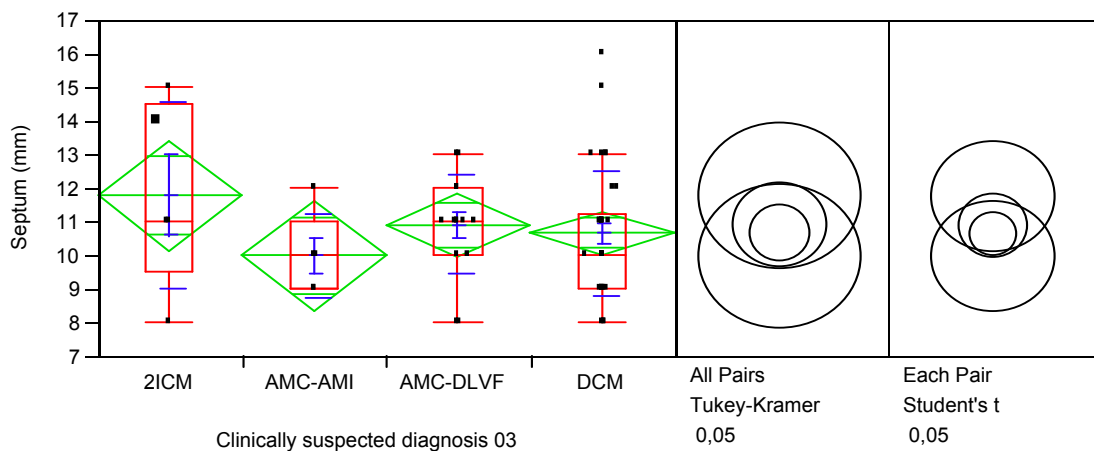
3.6.2 Weitere echokardiographisch Parameter

Ein serofibrinöser, hämorrhagischer oder eitriger Erguss zwischen parietalem und viszeralem Blatt des Perikards ließ sich in der Gruppe der AMC-DLVF (n= 2 /13,33%) und in der Gruppe der DCM (n=2/5,56%) nachweisen. Ein signifikanter Unterschied innerhalb der unterschiedlichen Gruppen gab es nicht.

Die Dicke des Septum atrioventriculare, der über der Wurzel des septalen Segels der rechten Atrioventrikularklappe gelegene Abschnitt des membranösen Teils der Kammerscheidewand, zeigt Abbildung 10. Ein deutlicher Unterschied innerhalb der unterschiedlichen Patientengruppen sowie bezogen auf die Probanden, konnte nicht verzeichnet werden.

Ab. 10: Septumdicke in mm bei den untersuchten ICM-, AMC-AMI-, AMC-DLVF- und DCM-Patienten

ICM	AMC-AMI	AMC-DLVF	DCM
11,8 \pm 2,77	10,00 \pm 1,22	10,93 \pm 1,48	10,67 \pm 1,87



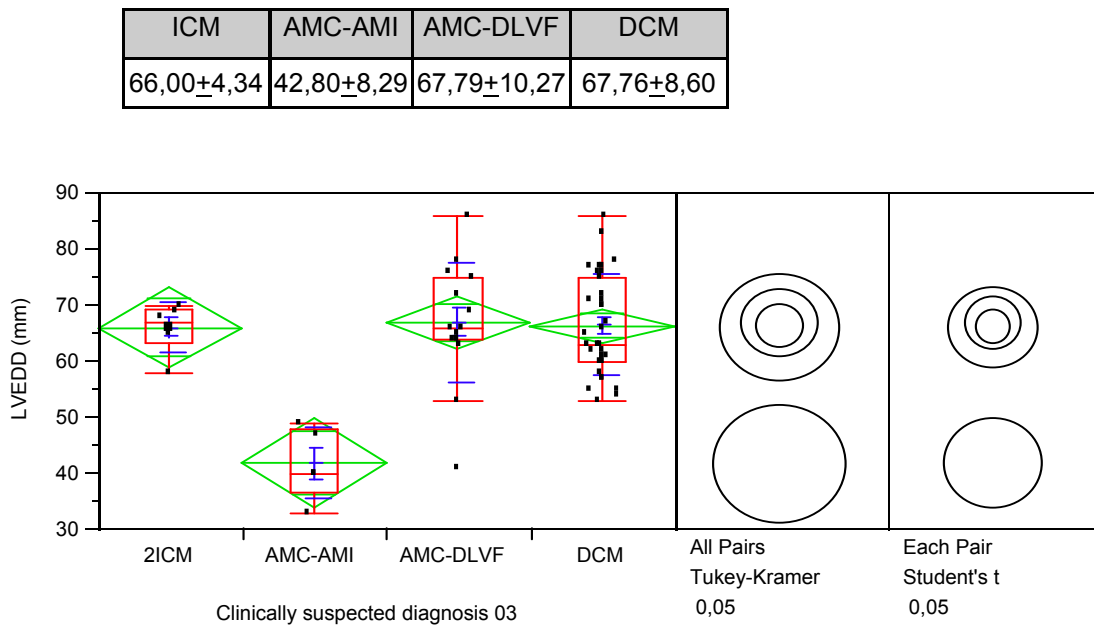
Legende: Die X- Achse zeigt die unterschiedlichen Patientengruppen, die Y-Achse die Septumdicke in mm .Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Gruppen.

Auch die Dicke der posterioren Wand (in mm) zeigte keine signifikanten Veränderungen. So fand sich eine posteriore Wand von 9,60 \pm 2,51 mm bei der Gruppe der ICM, 9,60 \pm 0,89 mm bei der Gruppe der AMC-AMI, 10,40 \pm 1,55 mm bei der Gruppe der AMC-DLVF und 10,06 \pm 1,35 mm bei den DCM-Patienten.

Die Wanddicke des linken Vorhofes wies Unterschiede zwischen den ICM-Kontrollen ($45,33 \pm 10,67$ mm) und den AMC-AMI Patienten ($32,60 \pm 3,05$ mm) auf ($p = 0,008$). Auch zwischen den beiden AMC – Gruppen konnte ein signifikanter Unterschied ($p = 0,0000397$) festgestellt werden (AMC-DLVF = $50,27 \pm 10,96$ mm). Eine im Vergleich zur AMC-AMI deutlich erhöhte Dicke des linken Ventrikels konnte auch mit $45,09 \pm 5,51$ mm bei den Patienten mit DCM nachgewiesen werden.

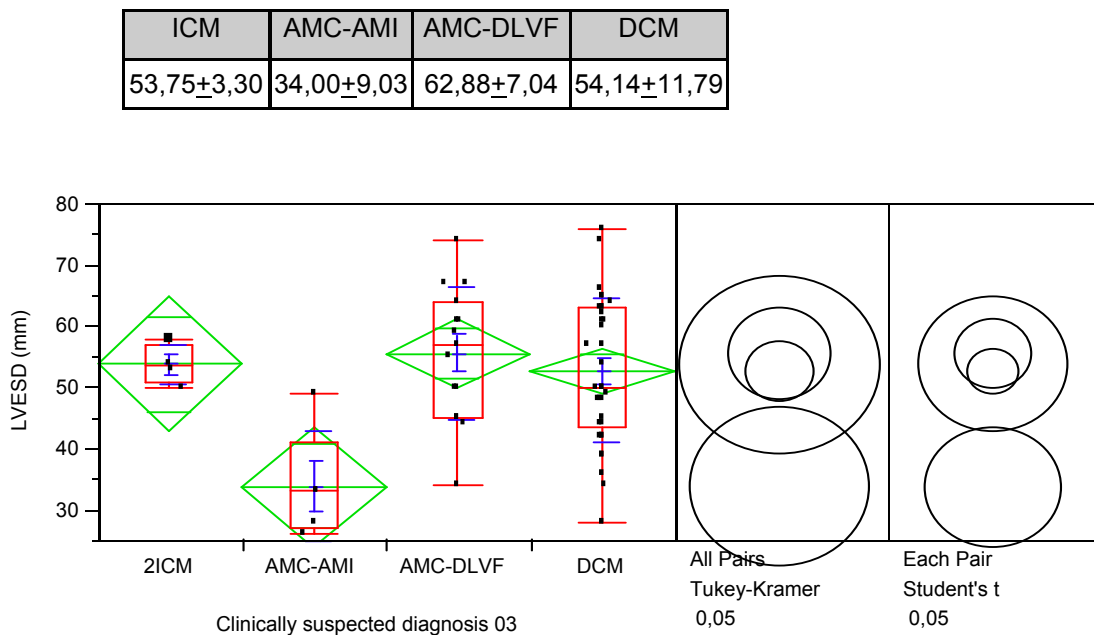
Eine linksventrikuläre Massenzunahme der Wanddicken und/oder des linksventrikulären Durchmessers (LVEDD) stellt ein unabhängiges Risiko für kardiovaskuläre Folgeereignisse und Gesamtmortalität dar. Abbildung 11 zeigt den LVEDD der unterschiedlichen Patientengruppen. Hier zeigte sich ein signifikanter Unterschied ($p < 0,0001$) bei der Gruppe der AMC-AMI Patienten verglichen mit den ICM- Kontrollen. Auch innerhalb der AMC- Gruppe konnte ein signifikanter Unterschied deutlich gemacht werden ($p < 0,0001$). Alle anderen Patienten- Gruppen wiesen keine Signifikanz zu den ICM- Kontrollen auf. Das gleiche Bild zeigt sich auch bei dem linksventrikulären endsystolischen Durchmesser (LVESD), der aus Abbildung 12 zu entnehmen ist. Auch hier ist ein signifikanter Unterschied ($p < 0,0001$) bei der Gruppe der AMC-AMI Patienten verglichen mit den ICM- Kontrollen zu verzeichnen, sowie auch innerhalb der AMC- Gruppe.

Abb. 11: Linksventrikulärer Enddiastolischer Durchmesser (LVEDD) in mm



Legende: Die X- Achse zeigt die unterschiedlichen Patientengruppen, die Y-Achse den linksventrikulären Enddiastolischen Durchmesser in mm. Es zeigten sich signifikante Unterschiede (AMC-DLVF- AMC-AMI: $p = 0,0000010$; ICM- AMC-AMI: $p = 0,0000320$; DCM – AMC-AMI: $p = 0,0000003$).

Abb. 12: Linksventrikulärer Endsystolischer Durchmesser (LVESD) in mm



Legende: Die X- Achse zeigt die unterschiedlichen Patientengruppen, die Y-Achse der linksventrikuläre Endsystolische Durchmesser in mm. Es zeigten sich signifikante Unterschiede (AMC-DLVF- AMC-AMI: $p = 0,0003285$; ICM-AMC-AMI: $p = 0,00896$; DCM-AMC-AMI: $p = 0,0007322$).

Bei einer akut oder chronisch auftretenden Schlussunfähigkeit der Mitralklappe zwischen dem linken Vorhof und dem linken Ventrikel durch Veränderungen im Bereich des Klappenannulus, der beiden Segel, der Chordae tendinae oder der Papillarmuskeln kommt es zur Mitralklappeninsuffizienz (MI). Das Ausmaß des Kontrastmittelrefluxes in den linken Vorhof sowie die Regurgitationsfraktion erlauben eine Graduierung der Mitralklappeninsuffizienz. Grad 1 zeigt einen minimalen Reflux mit einer Regurgitationsfraktion von <20%, Grad 2 weist eine komplette Anfärbung des linken Vorhofs nach mehreren Schlägen und eine Regurgitationsfraktion von 20-39% auf, Grad 3 zeigt zudem eine dichte und vollständige Anfärbung des linken Vorhofs bei einer Regurgitationsfraktion von 40-60% und bei Grad 4 kommt es sofort nach 1-2 Schlägen zur kompletten Anfärbung des linken Vorhofs mit einer Regurgitationsfraktion von > 60%. Tabelle 5 zeigt den Grad der Mitralklappeninsuffizienz bei den unterschiedlichen Patientengruppen sowie der ICM-Kontrollen. Der χ^2 nach Pearson wies ein p-Wert von 0,041 auf und ist somit leichtgradig signifikant.

Tabelle 5: Mitralsuffizienzgrad von ICM, AMC-AMI, AMC-DLVF und DCM Patienten

MI-Grad	0	1	2	3
ICM	n=4 (57,14%)	n=2 (28,57%)	n=1 (14,29%)	n=0 (0%)
AMC-AMI	n=4 (80,00%)	n=1 (20,00%)	n=0 (0%)	n=0 (0%)
AMC-DLVF	n=1 (6,67%)	n=10 (66,67%)	n=4 (26,67%)	n=0 (0%)
DCM	n=10 (27,78%)	n=19 (52,78%)	n=3 (8,33%)	n=4 (11,11%)

3.7 Viruspositivität

Verschiedene kardiotope Viren können bei Patienten mit klinischem Verdacht auf dilatative Kardiomyopathie und Myokarditis nachgewiesen werden. In den meisten Fällen heilt diese Virusmyokarditis mit und auch ohne Restschaden des Myokards aus. In einem geringen Prozentsatz von 10-15% kommt es allerdings zu einer chronischen progredienten linksventrikulären Funktionsstörung entsprechend dem klinischen Bild einer dilatativen Myokarditis. Es fanden sich 3 (60%) AMC-AMI-, 12

AMC-DLVF (80%)- und 23 (63,89%) DCM- Patienten mit Viruspositivität. So wurden auch Patienten ermittelt, die nur für einen bestimmten Virus (HHV6 oder PVB19) oder auch für beide Viren gleichzeitig positiv waren. Eine Signifikanz liegt mit einem p-Wert von 0,45 nicht vor. Eine detaillierte Auflistung der Viruspositivität innerhalb der verschiedenen Patientengruppen zeigt Tabelle 6.

Tabelle 6: Viruspositivität (HHV6, PVB19, und Koinfektion mit beiden Viren) in EMBs von AMC-AMI, AMC-DLVF- und DCM-Patienten

	0	HHV6	PVB19	HHV6+PVB19
AMC-AMI	n= 2 (40,00%)	n=0 (0%)	n= 3 (60,00%)	n=0 (0%)
AMC- DLVF	n= 3 (20,00%)	n=1 (6,67%)	n=10 (66,67)	n=1 (6,67%)
DCM	n=13 (36,11%)	n=1 (2,78%)	n=19 (52,77%)	n=3 (8,33%)

3.8 Regulatorische T-Zellen/FoxP3

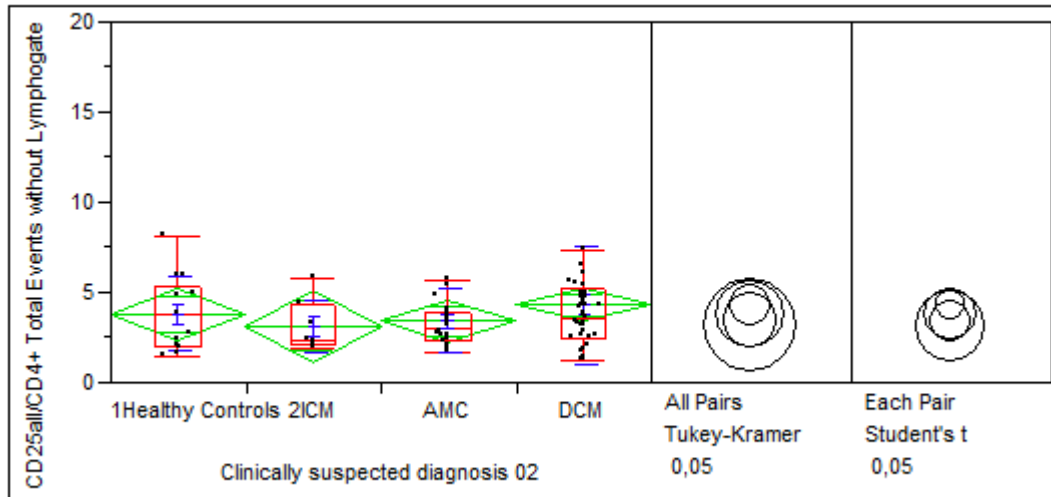
Da regulatorische T-Zellen (Tregs) essentielle Funktion im Rahmen von Autoimmunität, allergische Erkrankungen und anti- Tumor- Immunantworten zukommt, sind die an der Suppression beteiligten Mechanismen und Moleküle von großem therapeutischem Interesse. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit Tregs untersucht. Diese, wie auch konventionelle T-Zellen wurden mittels FACS- Analysen isoliert. Es erfolgte eine Sortierung in CD25 bzw. CD 4-Zellen.

Die Mechanismen der Toleranzvermittlung sind noch nicht vollständig aufgeklärt, die Tregs scheinen aber von wichtiger Bedeutung für die Aufrechterhaltung der immunologischen Toleranz zu sein.

Diese Zellen wurden bisher anhand der Oberflächenmarker CD4 und CD 25 identifiziert. CD4 lässt sich aber auch auf T-Helferzellen zu finden und CD25 findet sich auch auf der Oberfläche anderer T-Zellen, nach deren Aktivierung im Rahmen einer Immunantwort. Abbildung 13 zeigt die Anzahl aller CD 4/CD25 + Zellen in Prozent. Diese Population repräsentiert nur 1-4% der gesamten CD 4 Zellen. Während Gesunde Kontrollen $3,84 \pm 2,05\%$ CD4/CD25+ Zellen aufwiesen, zeigten ICM, AMC und DCM keine signifikanten Unterschiede.

Abbildung 13: CD25⁺/CD4⁺ PBMCs (%) im Vergleich zwischen Gesunde Probanden, ICM-Patienten, AMC- sowie DCM-Patienten.

Healthy controls	ICM	AMC	DCM
3,84± 2,05	3,19± 1,45	3,50± 1,73	4,37± 3,29



Legende: Die X- Achse zeigt die unterschiedlichen Patientengruppen, die Y-Achse die Anzahl CD25⁺/CD4⁺ PBMCs in Prozent. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.

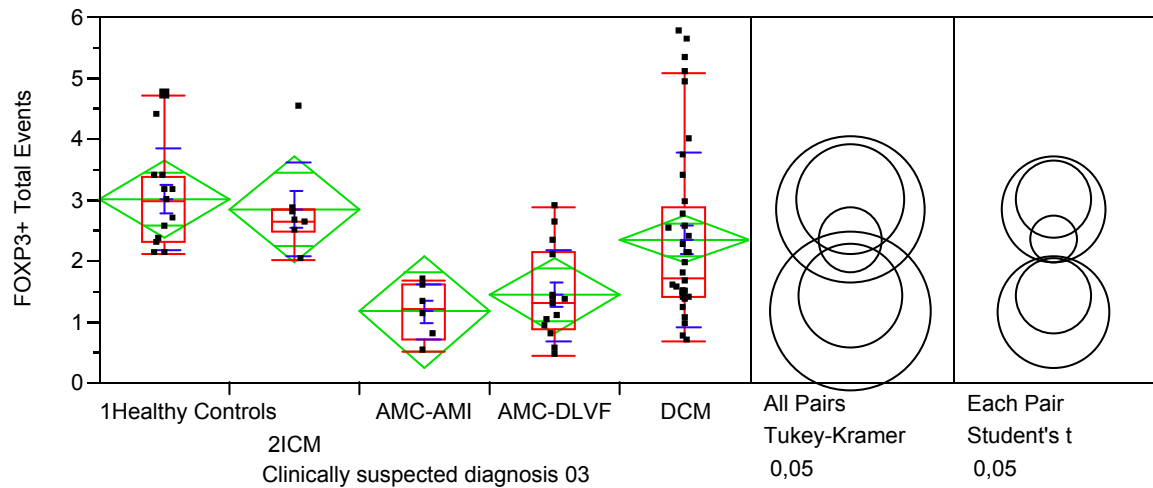
In der Maus lassen sich 2 Zellpopulationen abgrenzen, die CD4⁺CD25⁻ und CD4⁺CD25⁺ Zellpopulationen. Beim Menschen ist dies deutlich schwieriger. Die spezifischen funktionellen Eigenschaften der Treg werden vor allen Dingen den CD4⁺CD25^{high} T-Zellen zugeschrieben

Die Erfassung der regulatorischen T-Zellen erfolgte mit Hilfe von Antikörpern gegen den intrazellulären Marker FoxP3 Die phänotypische Analyse erfolgte mit Hilfe der Durchflusszytometrie nach Färbung der T- Zellen mit verschiedenen markierten monoklonalen Antikörpern. Die Methode ermöglicht die gleichzeitige Messung der Granularität, Zellgröße sowie die Expressionshöhe intrazellulärer Moleküle. Abbildung 14 und 15 zeigen die Anzahl FoxP3 positiver Zellen der unterschiedlichen Gruppen.

Hier zeigten sich signifikant erniedrigte FoxP3 Werte bei AMC und DCM Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden und ICM Patienten.

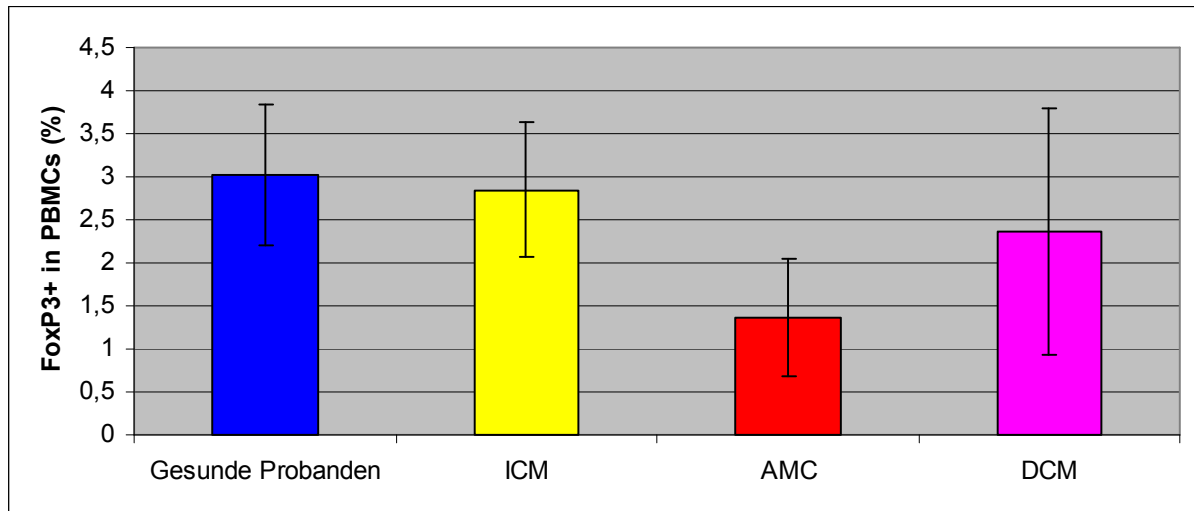
Abb. 14: FoxP3+ Total Events in Prozent

Healthy controls	ICM	AMC-AMI	AMC-DLVF	DCM
3,02± 0,82	2,85± 0,78	1,17±0,45	1,44±0,76	2,36±1,43



Legende: Die X- Achse zeigt die unterschiedlichen Patientengruppen, die Y-Achse die Anzahl der FoxP3+ Total Events. Es zeigten sich signifikante Unterschiede (Healthy controls - AMC-AMI: $p = 0,00010$; Healthy controls - AMC-AMI: $p = 0,0037$, DCM-AMC-AMI: $p = 0,0023$).

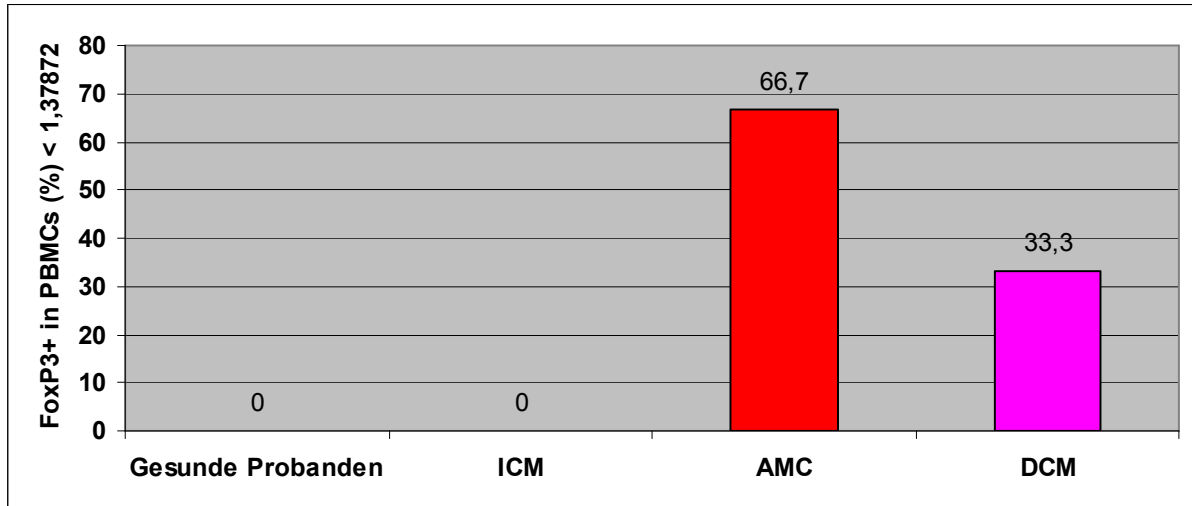
Abb.15: FoxP3+ PBMCs (%) bei gesunden Probanden, ICM, AMC und DCM Patienten.



Legende: Die X- Achse zeigt die unterschiedlichen Patientengruppen, die Y-Achse die Anzahl der FoxP3+ Total Events. Es zeigten sich signifikante Unterschiede (Gesunde Probanden, ICM Patienten - AMC: $p < 0,05$; Gesunde Probanden, ICM Patienten - DCM: $p < 0,05$)

Auf der Basis der statistischen Verteilung von FoxP3⁺ PBMCs bei gesunden Probanden und ICM-Patienten wurde ein unterer Grenzwert (Mittelwert – 2xfache Standardabweichung) von 1,37872% ermittelt. 66,7% der AMC- und 33,3% der DCM-Patienten zeigten erniedrigte Frequenzen von FoxP3⁺ PBMCs (Abb. 16). Es ergaben sich keine Differenzen hinsichtlich statistisch erhöhter (>4,53528%) FoxP3⁺ PBMCs zwischen den untersuchten Patientengruppen.

Abbildung 16: FoxP3+ PBMCs (%) im Vergleich zwischen Gesunde Probanden, ICM, AMC und DCM Patienten zusammengefasst.



Physiologisch erfolgt die Aktivierung von T-Zellen über den T-Zellrezeptor (TCR), der mit dem CD3 Molekül assoziiert ist und costimulatorischen Molekülen.

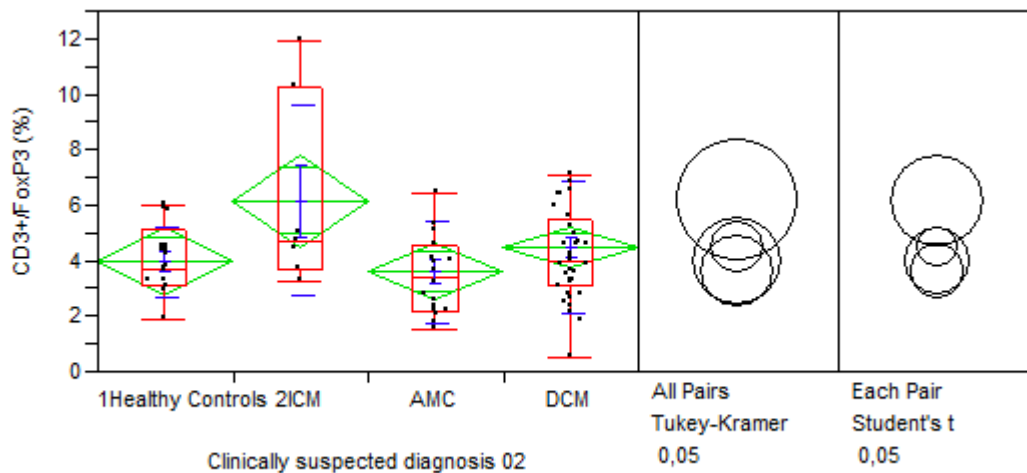
Auf der Basis der statistischen Verteilung von CD3/FoxP3⁺ PBMCs bei gesunden Probanden, ICM-Patienten sowie der AMC-AMI-, AMC-DLVF- und DCM-Patienten wurde ebenfalls ein unterer Grenzwert (Mittelwert – 2fache Standardabweichung) von 1,383% und ein oberer Grenzwert von 2,3059% ermittelt. Es ergaben sich keine Unterschiede hinsichtlich statistisch signifikant erniedrigten und erhöhten CD3/FoxP3⁺ PBMCs zwischen den untersuchten Patientengruppen (Tabelle 7/Abbildung 17).

Tabelle 7: CD3/FoxP3+ PBMCs (%) im Vergleich zwischen Gesunde Probanden, ICM-, AMC- und DCM Patienten zusammengefasst.

	Healthy controls	ICM	AMC-AMI	AMC-DLVF	DCM
CD3/FoxP3 < 1,3833	n= 4 (30,77%)	n= 1 (14,29%)	n= 2 (33,33%)	n=6 (42,86%)	n=12 (33,33%)
CD3/FoxP3 > 2,3059	n= 3 (23,06%)	n= 2 (28,57%)	n= 0 (0%)	n=3 (21,43%)	n=11 (30,56%)

Abbildung 17: CD3+/FoxP3+ PBMCs (%) im Vergleich zwischen Gesunde Probanden, ICM-Patienten und AMC- sowie DCM-Patienten.

Healthy controls	ICM	AMC-AMI	AMC-DLVF	DCM
4,01±1,27	6,20±3,45	3,23±1,62	3,81±1,6	4,51±2,37



Legende: Die X- Achse zeigt die unterschiedlichen Patientengruppen, die Y-Achse die Anzahl CD3+/FoxP3 PBMCs in Prozent. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.

4 Diskussion

Die Zielsetzung der Arbeit war es, Kenntnisse über die dilatative Kardiomyopathie und der akuten Myokarditis zu gewinnen, die Frequenz von FoxP3⁺ Zellen bei Patienten mit der klinischen Präsentation einer AMC und DCM im Vergleich zu gesunden Probanden und Patienten mit ischämischer Kardiomyopathie (ICM) zu bestimmen, Möglichkeiten zur Isolierung und Markierung von regulatorischen T-Zellen zu finden und Hinweise zur therapeutischen Relevanz von regulatorischen T-Zellen bei der dilatativen Kardiomyopathie und akuten Myokarditis zu eruiert.

Im Vergleich zwischen gesunden Probanden, ICM, AMC und DCM Patienten zeigten sich signifikant erniedrigte prozentuale FoxP3 Frequenzen bei AMC-Patienten. Auf der Basis der statistischen Verteilung von FoxP3⁺ PBMCs bei gesunden Probanden und ICM-Patienten wurde ein unterer Grenzwert (Mittelwert – 2xfache Standardabweichung) von 1,37872% ermittelt. 66,7% der AMC- und 33,3% der DCM-Patienten zeigten erniedrigte Frequenzen von FoxP3⁺ PBMCs. Es ergaben sich keine Unterschiede hinsichtlich statistisch signifikant erhöhter (>4,53528%) FoxP3⁺ PBMCs zwischen den untersuchten Patientengruppen.

4.1 Immunantwort

Immunantworten sind sowohl quantitativ als auch qualitativ darauf ausgelegt, eine optimale Abwehrleistung zu erzielen. So wird der Organismus durch das Immunsystem vor dem Angriff krankheitserregender Mikroorganismen wie Bakterien, Viren und Pilze geschützt. Doch dies ist nicht die einzige Aufgabe des Immunsystems. Es sollen nicht nur die unterschiedlichsten Krankheitserreger erfolgreich bekämpft, sondern auch die natürliche Tendenz zur Autoimmunität unter Kontrolle gehalten und die Lymphozyten-Effektorpopulationen durch homöostatische Prozesse in ausreichender sowie funktionsfähiger Anzahl bereitgestellt werden (95,96,97).

Zu diesem Zweck verfügt das Immunsystem über ein großes Arsenal sehr effizienter und schnell wirkender Mechanismen. Hierzu zählen die Deletion von peripheren T-Zellen, die differentielle Wirkungsweise der Zytokine IL-10 und TGF- β , die Konkurrenz um Antigene, Wachstums- oder Differenzierungsfaktoren, die Limitierung

der klonalen Expansion durch Aktivierung von CTLA4 sowie die Induktion des programmierten Zelltodes über die verschiedensten Signale. Da allerdings auch die Gefahr besteht, dass sich diese Mechanismen gegen den Organismus selbst richten, welche zu allergischen und autoimmunen Erkrankungen führt, müssen sie streng kontrolliert und reguliert werden (98).

In den letzten Jahren haben sich zusätzlich die Hinweise gehäuft, dass auch sogenannte regulatorische T-Zellen an der Limitierung einer Immunantwort gegenüber Fremdanitigenen und an der Erhaltung der Toleranz gegenüber Selbst-Antigenen zentral beteiligt sein könnten. Regulatorische T-Zellen (Tregs) gehören zu den derzeit am intensivsten erforschten Zellen des Immunsystems. Sie besitzen potente suppressorische Eigenschaften, die es ihnen ermöglichen, Immunreaktionen zu verringern oder abzuschalten. Durch diese Funktion stellen sie eine bedeutende Kontrollinstanz für die Balance des Immunsystems dar (97).

Eine formelle molekulare Definition für diese Zellen entstand mit der Entdeckung, dass diese den Transkriptionsfaktor FoxP3 (Forkhead box protein 3) exprimieren (97). Das Molekül FoxP3, das zur Familie der Forkhead-box-Transkriptionsfaktoren gehört, wurde im Jahr 2001 durch eine molekulargenetische Analyse der sogenannten „scurfy“-Maus entdeckt. In dieser Maus konnte nachgewiesen werden, dass deren starker Autoimmunitätsphänotyp durch eine Frameshift-Mutation im *foxp3*-Gen verursacht wird, die zu einem sofortigen Abbau der FoxP3-Moleküle führt. Vergleichbare Mutationen im FoxP3-Gen wurden auch bei Patienten gefunden, die unter dem IPEX-Syndrom (immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked) leiden (94).

4.2 die Rolle regulatorischer T-Zell Frequenzen

Die an der Aufrechterhaltung der immunologischen Homöostase beteiligten regulatorischen CD4⁺CD25⁺ T-Zellen sind in ihrer Entwicklung und Funktion abhängig von dem Transkriptionsfaktor FoxP3. Neben den natürlich vorkommenden regulatorischen CD4⁺CD25⁺ T_{reg} Zellen, die sich FoxP3 abhängig entwickeln, sind auch andere T-Zellen mit suppressiver Eigenschaft bekannt. Hierzu gehören z.Bsp. natürliche Killer T-Zellen oder CD8⁺CD28⁻ T-Zellen. Sie unterscheiden sich in ihrer Entwicklung, durch die Expression von FoxP3 und dem Mechanismus ihrer

suppressiven Eigenschaften. Eine hohe Expression von FoxP3 ist charakteristisch von Treg Zellen, eine eingeschränkte Expression, im Gegensatz dazu kennzeichnet eine stark regulierte, eingeschränkte Expression in Abhängigkeit der T- Zell Rezeptor Stimulation nicht regulatorische Effektorzellen.

CD4⁺/CD25⁺ T regulatorische Zellen besitzt eine potente inflammatorische Kapazität in Tiermodellen, die eine intestinale Entzündung aufweisen (89). Dies ist die erste Studie, die CD4⁺/CD25⁺ T regulatorische Zellen bei akuter Myokarditis und dilatativer Kardiomyopathie untersucht und vergleicht. Der Anstieg der FoxP3 Zellen bei der dilatativen Kardiomyopathie ist signifikant niedriger als bei einer akuten Myokarditis. Dies konnte auch bei zwei Auto-Immunerkrankungen (graft versus host disease und der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen) nachgewiesen werden. Hier konnten erniedrigte Frequenzen von sich im Thymus als CD4⁺CD25⁺⁺ (high) bzw. FoxP3⁺ Tregs entwickelnden Zellen (PBMCs) beschrieben werden. Hingegen zeigten Patienten mit einer akuten Divertikulitis erhöhte FoxP3⁺ Frequenzen auf, was die Regulierbarkeit der Tregs in PBMCs bei unterschiedlichen immunvermittelten Erkrankungen verdeutlicht (90).

Bevor die wichtige Rolle von regulatorischen CD4 CD25^{high} T Zellen bekannt wurde, evaluierten Studien CD 25 als den aktivierenden Marker. In dieser Arbeit wurden die CD4⁺/CD25⁺ T-Zellen mittels FACS- Analysen gemessen. Es ergaben sich keine Unterschiede hinsichtlich der statistischen Signifikanz zwischen den untersuchten Patientengruppen sowie der Kontrollgruppe. Maul et al zeigten auch in Ihrer Studie, dass die CD 25⁺ Zellen nicht notwendigerweise die Anzahl von CD 25^{high} T- Zellen reflektieren. Auch hier konnte dargestellt werden, dass die Anzahl von CD25 Zellen in den unterschiedlichen Darmerkrankungen annähernd ähnliche Werte aufwiesen, jedoch konnte ein Unterschied in der Zahl der CD4⁺ CD25^{high} T- Zellen gezeigt werden. Die vorliegende Arbeit konnte diese Aussage bestätigen. Während sich keine Unterschiede hinsichtlich der statistischen Signifikanz zwischen den untersuchten Patientengruppen sowie der Kontrollgruppe ergaben, zeigten sich jedoch deutliche Signifikanzen in der Anzahl der CD 25^{high} Population. Im zusammenfassenden Vergleich zwischen Kontrollen (gesunde Probanden und ICM-Patienten) und AMC- und DCM-Patienten ergaben sich bei der letzteren Patientengruppe signifikant (p=0,0029) erniedrigte Frequenzen von FoxP3⁺ PBMCs. Interessant wäre hier ein Vergleich von peripheren mononukleären Zellen (PBMCs) aus EDTA-Blut von Patienten mit klinischem V.a. AMC und DCM, sowie von gesunden

Probanden als auch von Patienten mit ICM (Herzinsuffizienz nicht-DCM-Genese) als Kontroll-Population mit der Anzahl von FoxP3- Zellen in der Endomyokardbiopsie. Aus ethischen Gründen könnten jedoch EMBs-Untersuchungen nur an AMC und DCM Patienten vorgenommen werden, weil hierbei die EMBs-Diagnostik eine klinische Routine darstellt. Das heißt ein Vergleich der Endomyokardbiopsien von Patienten mit AMC beziehungsweise DCM mit der Kontrollpopulation ist nicht möglich.

Der Mechanismus der die Frequenz peripherer CD4⁺CD25⁺ T-regulatorischer Zellen reguliert, ist immer noch unklar. Bekannt ist, dass CD25⁺ regulatorische T Zellen sowohl den T-Zellrezeptor (TCR) zur Interaktion mit Peptidantigenen als auch den Toll- like Rezeptor (TLR) exprimieren. TLRs dienen der Erkennung von PAMPs (*Pathogen Associated Molecular Patterns*). Das sind Strukturen, welche ausschließlich auf oder in Krankheitserregern vorkommen und steuern entsprechende Aktivierungen von Genen. Daher können CD25⁺ regulatorische T Zellen durch bakterielle Stimulation differenzierte Regulationen ausführen. Die Daten dieser Arbeit zeigen eine geringere Anzahl von CD4⁺CD25^{high} T regulatorischen Zellen bei Patienten mit AMI beziehungsweise DCM im Vergleich mit ICM Patienten beziehungsweise Probanden, was darauf schließen lassen könnte, dass diese Zellen eine beeinträchtigte Suppressorfunktion aufweisen. Jedoch konnte Maul et al in Ihrer Studie über Darmerkrankungen belegen, dass CD4⁺CD25⁺ T-regulatorischer Zellen eine normale Suppressorfunktion aufwiesen. Unsere Daten lassen vermuten, dass Patienten mit akuter Myokarditis beziehungsweise dilatativer Kardiomyopathie einen numerischen Defekt aufzeichnen, der den CD4⁺CD25^{high} T- Zellpool vermindert und für eine insuffiziente Versorgung mit regulatorischen T- Zellen führt.

Das therapeutische Potential CD4⁺CD25^{high} Tregs sollte daher weiter erforscht werden.

4.3 Isolierung und Markierung regulatorischer T- Zellen

CD4⁺CD25⁺ und CD4⁺CD25⁻ zeigen beide regulatorische T-Zell Funktionen. Sie unterscheiden sich in der Verwendung unterschiedlicher Suppressormechanismen.

Natürlich vorkommende regulatorische CD4⁺CD25⁺ T_{reg} Zellen haben sich als eine Foxp3 abhängige Subpopulation von Suppressor T-Zellen erwiesen. Fehlt FoxP3 kommt es somit zum Verlust von CD4⁺CD25⁺ T_{reg} Zellen, was zu einem letalen Immundefekt mit multiplen Autoimmunkrankheiten führt (79). Bei Menschen sind

CD4⁺CD25⁺ T_{reg} Zellen durch eine starke Expression des Oberflächenmoleküls CD 25^{high} gekennzeichnet. Diese Population repräsentiert nur etwa 1-3% der CD4⁺ T-Zellen (80). Zur Charakterisierung spezifischer T- Zellen dienen vornehmlich die alpha- Kette des Interleukin 2 Rezeptors (CD25) und der Transkriptionsfaktor FoxP3. CD 25 gilt als Aktivierungsmarker.

Um den optimalen CD25 Antikörper für die Foxp3-Messung zu finden, wurden mittels FACS-Analyse 2 unterschiedliche Klone unterschiedlicher Hersteller (Klon BC 96 von eBioscience; und Klon M-A251 von BD Bioscience, San Diego, USA) ausgetestet. In der FACS-Analyse wurden die Lymphozyten umrahmt (*gating*) und der Marker anhand der Isotypenkontrolle gesetzt.

Die Testung zeigte, dass der Klon BC96 CD25 Maus-anti-human-Antikörper der Firma eBioscience mit 9,4% der CD25 positiven T- Lymphozyten etwas schlechter markierte als der Klon M-A251 von BD Bioscience. Die folgenden FACS-Analysen verwendeten den Klon M-A251. Die Unterschiede werden in Abbildung 18 deutlich sichtbar.

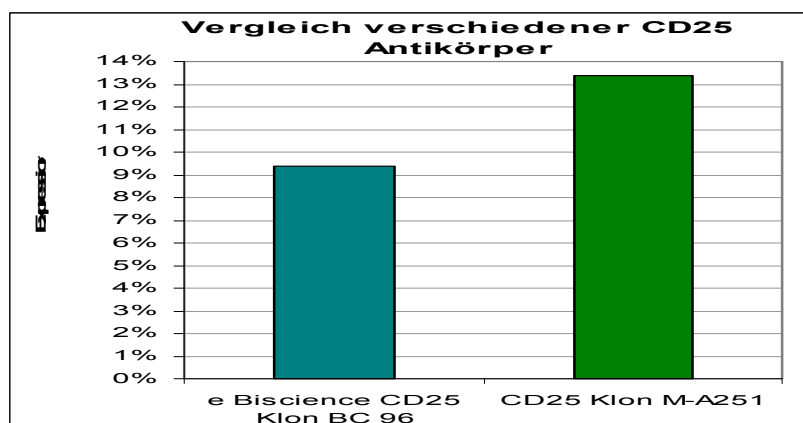


Abb. 18: Vergleich von 2 verschiedenen CD25 Antikörpern

Legende: Die X-Achse zeigt die 2 getesteten CD 25 Antikörper (Klon BC 96 und M-A251). Die Y-Achse spiegelt die bessere Anfärbarkeit mit Klon M-A251 wieder. Während Klon BC 96 9,4 % der T- Lymphozyten als CD25+ markierte, konnte der Klon M-A251 13,4% positive CD 25 T- Lymphozyten markieren.

Um eine angemessene Zellzahl für potentiell klinische Anwendungen zu erreichen, bedarf es somit der Etablierung von Protokollen, die eine sichere Expansion dieser Zellen ex vivo erlauben.

Ein weiteres Problem stellte auch der passende FoxP3 Antikörper dar. Die Messungen der vorliegenden Arbeit zeigten, dass der PE gekoppelte FoxP3-Antikörper teilweise unspezifisch bindet. Dies konnte anhand der Verschiebung der Gesamtpopulation in den FACS- Analysen festgestellt werden. Der Hersteller des PE-gekoppelten FoxP3 Antikörper PCH 101 beschreibt diese Verschiebung jedoch nicht. Auch eine Studie von Gavin et al zeigt dieses Phänomen, jedoch bleibt die Verschiebung in der Diskussion unberücksichtigt (102). Eine andere Studie testete die Spezifität des FoxP3 Antikörpers, indem sie FoxP3 Bindungen durch ungekoppelten FoxP3 Antikörper blockierten. Es zeigte sich, dass der verwendete Antikörper zum Teil unspezifisch bindet.

In der vorliegenden Arbeit fanden sich bei der Messung des PE gekoppelten Antikörpers häufig 2 Hauptpopulationen. Eine mögliche Erklärung liegt darin, dass es sich hierbei um eine Population FoxP3^{high} T- Zellen und eine Mischpopulation aus FoxP3⁺ T- Zellen als auch FoxP3 – T Zellen handeln könnte. Die FoxP3^{high} T- Zellen wurden mittels Quadranten abgegrenzt und mit den Werten der gesunden Probanden verglichen.

Dennoch gestaltet sich die genaue Bestimmung der FoxP3⁺ T- Zellen in einer Zellpopulation mit dem vom Hersteller empfohlenen PE- gekoppelten FoxP3 Antikörper PCH 101 als schwierig und nicht immer als genau. Aufgrund des hohen Anteils von spezifischen Bindungen erlaubt die Messung dennoch eine Abschätzung des Verhältnisses der FoxP3^{high} T- Zellen zur restlichen T- Zellpopulation.

Um eine noch genauere Aussage zur Spezifität des FoxP3 Antikörpers treffen zu können, sollten verschiedene Antikörper hinsichtlich ihrer Spezifität getestet werden.

Der in dieser Arbeit gewählte Ansatz der Zellsortierung als Grundlage zur Isolation von humanen CD4⁺CD25^{high} T-Regs verdeutlicht diese Problematik, da für die Markierung der Lymphozyten mit dem intrazellulären Antikörper FoxP3 mindestens 1×10^6 Zellen benötigt wurden.

Die etablierte durchflusszytometrische Erfassung des Transkriptionsfaktors FoxP3 mittels FACS (*fluorescence activated cell sorting*; fluoreszenzaktivierter Zellsorter) erlaubt die qualitative und quantitative Darstellung des Markers auf Einzelebene innerhalb der untersuchten Zellpopulation. Voraussetzung hierfür ist eine Markierung durch Fluorochrom-Antikörperkonjugaten. Eine Beurteilung der Zellen war jedoch manchmal erschwert, wenn der Zellmarker nicht spezifisch exprimiert wurde. Zudem gilt die Durchflusszytometrie als eine komplizierte Messung. Andere Studien

versuchten ein quantitatives, auf Echtzeit (real time)- PCR basierendes Nachweissystem zu etablieren, das es ermöglicht im peripheren Blut Tregs auf 0,25% exakt zu bestimmen und somit komplizierte Standardmessungen abzulösen (100,101). Allerdings korreliert diese Methode mit keinem anderen Zellmarker, so dass diese Methode auf Spezifität angezweifelt werden muss.

Es könnte in Zukunft jedoch möglicherweise eine Durchflusszytometrie- Analytik zu Gunsten einfacherer und wirtschaftlicher Alternativen abgelöst werden.

Ein weiteres Problem entstand durch die lange Aufarbeitungszeit der Zellen. Das Protokoll der Firma eBioscience zur Isolierung und Markierung von regulatorischen T-Zellen sieht eine Aufarbeitung von Blutlymphozyten in einem Schritt vor. Da der zeitliche Aufwand der Messungen sehr groß war und nicht immer garantiert werden konnte, dass die Blutentnahmen immer morgens stattfinden konnten, wurde bereits vorab der Unterschied zwischen frisch präparierten und eingefrorenen PBMCs getestet. Hierbei konnte an drei Probanden festgestellt werden, dass der Unterschied zwischen frisch präparierten und aufgetauten PBMCs bei $CD4^+CD25^+$ Färbungen bei 1,1% zu Gunsten der frisch präparierten PBMCs lag. Bei einer weiteren Testung von $CD4^+ CD25^+ Foxp3^+$ Färbungen konnte bei einem Probanden sogar ein positiver Effekt von 0,6% zu Gunsten der eingefrorenen PBMCs festgestellt werden (Abb. 19/20).

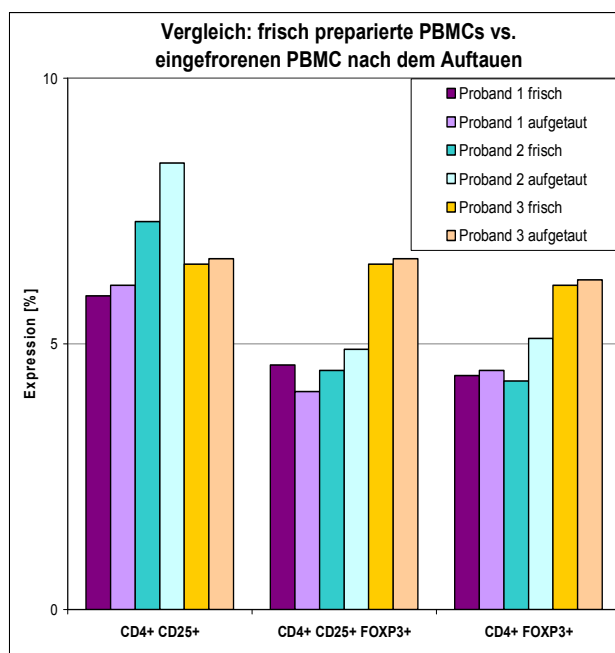


Abb.19: Vergleich von frisch präparierten und eingefrorenen PBMCs

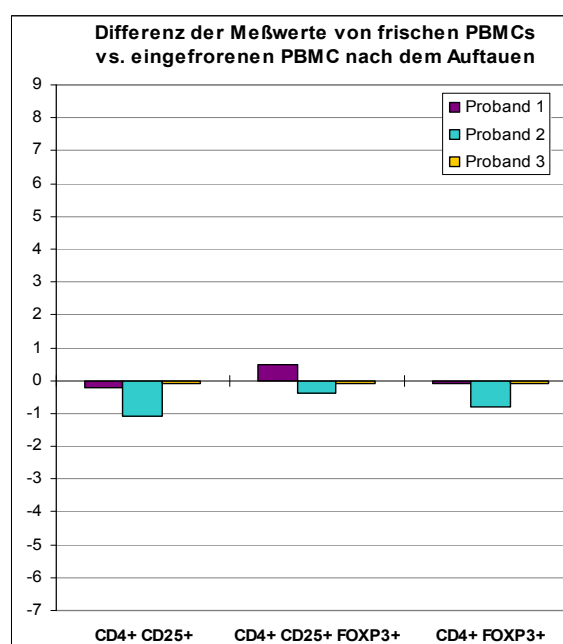


Abb.20: Differenz der Messwerte von frisch präparierten versus eingefrorenen PBMCs

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass es keine signifikante Differenz zwischen frisch präparierten und eingefrorenen PBMCs für die FACS-Messung gab. Daher wurde bei allen Probanden- und Patientenmessungen eingefrorene PBMCs verwendet. Somit konnte das Problem der klinischen Anwendung mit Durchführung der oben erwähnten 2-zeitigen Methode gelöst werden.

4.4 Relevanz regulatorischer T- Zellen bei Erkrankungen

Bisherige Ergebnisse über regulatorische T- Zellen beim Menschen stammen aus retrospektiven Studien und in vitro Versuchen aus der Transplantationsmedizin, der Onkologie und dem Monitoring von Autoimmunerkrankungen. Die Rolle von regulatorischen T-Zellen (Tregs), die durch den Transkriptionsfaktor FoxP3 charakterisiert werden, ist sowohl bei der akuten Myokarditis als auch bei der dilatativen Kardiomyopathie bislang nicht untersucht. Tregs könnten zum einem vor einer überschießenden, gewebstestruierenden Immunantwort schützen, zum anderen aber auch die effektive Viruselimination über die Hemmung der antiviralen Immunantwort fördern (15). T-regulatorische Zellen halten normalerweise das

Immunsystem im Gleichgewicht. Ist die Anzahl der Treg- Zellen reduziert, so wie bei der DCM und vor allem der akuten Myokarditis, oder ist deren Funktionalität gestört, kann das Immunsystem aus der Balance geraten. Die Immunzellen, die eigentlich Bakterien und Viren erkennen und zerstören sollen, greifen körpereigenes Gewebe und Organe an. Kürzlich entstand eine Studie, die belegte, dass Bluthochdruck bedingte Herzverdickung und Herzrhythmusstörungen bei Mäusen durch Injektion von Tregs gemildert werden konnte. Eine weitere Studie zeigte, dass regulatorische T-Zellen einer Tumorrogression entgegenwirken.

Die Depletion regulatorischer T- Zellen stellt somit einen ersten therapeutischen Ansatz dar. Die Depletion über Anti- CD25 gerichtete Antikörper konnte in mehreren Studien erste Erfolge verzeichnen. Taylor und Kollegen zeigten in ihrer Studie, dass durch eine Depletion der CD 25 Zellen eine Minderung der Rezidivrate bei HPV 16 induzierten Tumoren angestrebt werden konnte(103). Jedoch belegten auch andere Studien, dass es durch eine Behandlung mit anti- CD 25 Antikörper zu einer funktionellen Inaktivierung der CD 25 exprimierenden Zellen kam. Es folgten hier vermehrte Infektanfälligkeit und vermehrte selbstgerichtete Immunreaktionen (104).

Ein möglicher therapeutischer Ansatz von regulatorischen T-Zellen zur Behandlung der akuten Myokarditis beziehungsweise der dilatativen Kardiomyopathie liegt in der Viruselimination und somit einer verbesserten links-ventrikulären Ejektionsfraktion (LVEF). Jedoch ist die antivirale Immunantwort bei DCMi unvollständig verstanden. Auf der Basis tierexperimenteller Befunde aus dem Coxsackie B Virus Mausmodell sowie Ergebnissen von DCMi Patienten wird davon ausgegangen, dass eine initiale stark ausgeprägte, Th1/CTLs (zytotoxische T-Zellen) polarisierte Immunantwort zu einer raschen Viruselimination und somit Ausheilung der kardialen Virusinfektion führt. Hingegen eine suboptimale Th1/CTLs gestützte, bzw. Th2 gewichtete Immunantwort eine ineffektive Viruselimination fördert und somit über die Viruspersistenz zu einem Progress der DCMi beiträgt. Genau hier müsste die Behandlung mit anti CD 25 gerichtete Antikörper ansetzen, um eine eindeutige klinische Besserung der akuten Myokarditis beziehungsweise dilatativen Kardiomyopathie zu erreichen. Daher ist die Kenntnis über Differenzierung, Spezifizierung und Subphenotypisierung FoxP3 regulatorischer T Zellen unabdingbar (105). Eine Hauptschwierigkeit bei der klinischen Applikation dieser Zellen ist deren geringe Anzahl im peripheren Blut. Deshalb wird es nötig sein, die Zellen außerhalb des Körpers zu kultivieren und zu vermehren, um sie in ausreichender Form verabreichen zu können.

4.5 Schlussfolgerung

Die Daten der vorliegenden Arbeit zeigen erstmalig signifikant erniedrigte Frequenzen von FoxP3⁺ regulatorischen T-Zellen bei PBMCs von DCM- und insbesondere AMC-Patienten.

Diese Befunde sind nicht ein Epiphänomen der Herzinsuffizienz, da sich keine signifikanten Unterschiede bei ICM-Patienten mit langjähriger Herzinsuffizienz ischämischer Genese zeigten.

Eine detaillierte Sub-Analyse im Vergleich mit den EMBs-Untersuchungen (DCMi: immunhistologischer Nachweis einer intramyokardialen Entzündung und einer kardiotropen Virusinfektion) könnte die Assoziation der erniedrigten FoxP3⁺ Frequenz in PBMCs von AMC- und DCM-Patienten mit diesen pathogenetischen Merkmalen der DCMi eruieren.

Das wachsende klinische Interesse an der Entwicklung von regulatorischen T- Zell-Therapien für die Behandlung von Autoimmunerkrankungen oder der Transplantations- Abstoßung sowie kardiologischer Erkrankungen bedingt somit die Notwendigkeit für die genaue Kenntnis von FoxP3 regulatorischen T- Zellen.

5 Zusammenfassung

Es besteht eine ätiopathogenetische Assoziation zwischen der akuten Myokarditis (AMC) und der dilatativen Kardiomyopathie (DCM). Kardiotrope Viren (am häufigsten das Parvovirus B19/B19V ermittelt durch nested PCR/nPCR;) und eine intramyokardiale Entzündung (Immunhistologie) können in Endomyokardbiopsien (EMBs) von ca. 60% der Patienten mit der klinischen Präsentation einer AMC oder DCM nachgewiesen werden, was mit der WHO-Definition einer „inflammatorischen Kardiomyopathie“ (DCMi) übereinstimmt. Insbesondere die Viruspersistenz ist mit einer progredienten Einschränkung der linksventrikulären Ejektionsfraktion (LVEF) assoziiert. Die Rolle von regulatorischen T-Zellen (Tregs), die durch den Transkriptionsfaktor FoxP3 charakterisiert werden, ist bei der DCMi bislang nicht untersucht. Tregs könnten einerseits vor einer überschießenden, gewebsdestruierenden Immunantwort schützen, andererseits aber auch die effektive Viruselimination über die Hemmung der antiviralen Immunantwort fördern.

Ziel: Die Zielsetzung der Arbeit war es, die Frequenz von FOX-P3⁺ Zellen bei Patienten mit der klinischen Präsentation einer AMC und DCM im Vergleich zu gesunden Probanden und Patienten mit ischämischer Kardiomyopathie (ICM) zu bestimmen. Die Zielsetzung der Arbeit war es, Kenntnisse über die dilatative Kardiomyopathie und der akuten Myokarditis zu gewinnen, die Frequenz von FoxP3⁺ Zellen bei Patienten mit der klinischen Präsentation einer AMC und DCM im Vergleich zu gesunden Probanden und Patienten mit ischämischer Kardiomyopathie (ICM) zu bestimmen, Möglichkeiten zur Isolierung und Markierung von regulatorischen T-Zellen zu finden und Hinweise zur therapeutischen Relevanz von regulatorischen T-Zellen bei der dilatativen Kardiomyopathie und akuten Myokarditis zu eruiert.

Methodik: Die Arbeit untersuchte periphere mononukleäre Zellen (PBMCs) aus EDTA-Blut von Patienten mit klinischem V.a. AMC und DCM und von gesunden Probanden sowie von Patienten mit ICM (Herzinsuffizienz nicht-DCM-Genese) als Kontroll-Population. Aus ethischen Gründen konnten EMBs-Untersuchungen nur an AMC und DCM Patienten vorgenommen werden, weil hierbei die EMBs-Diagnostik eine klinische Routine darstellt.

Die PBMCs wurden mittels Ficoll-Gradienten (PAA, Cölbe, BRD) isoliert. Anschließend wurden unspezifische Bindungsstellen der Zellen mittels Beriglobin

(1:50 in PBS; Behring, Marburg, DRD) saturiert. Anschließend wurden die Zellen mit der *working solution* (Permeabilisierung der Zellmembran für die Durchdringung von Maus-anti-FoxP3 Antikörper) über 60 min inkubiert. Nach zweimaliger Waschung mit je 1 ml Permeabilisierungspuffer folgte die Gabe von 10 µL Maus-anti-human FoxP3-PE Antikörper (Klon: PCH101; Natutec, Frankfurt a.M., BRD) und eine Inkubation von 30 Minuten bei 4 °C. Nach erneutem Waschen mit je 1 ml Permeabilisierungspuffer und anschließender Waschung mit je 2 ml PBS wurden die PBMCs mittels FACS-Analyse am FACS-Calibur (Becton Dickinson, Heidelberg, BRD) gemessen.

Resultate: Im Vergleich zwischen gesunden Probanden, ICM, AMC und DCM Patienten zeigten sich signifikant erniedrigte prozentuale FoxP3 Frequenzen bei AMC-Patienten. Auf der Basis der statistischen Verteilung von FoxP3⁺ PBMCs bei gesunden Probanden und ICM-Patienten wurde ein unterer Grenzwert (Mittelwert – 2xfache Standardabweichung) von 1,37872% ermittelt. 66,7% der AMC- und 33,3% der DCM-Patienten zeigten erniedrigte Frequenzen von FoxP3⁺ PBMCs. Es ergaben sich keine Unterschiede hinsichtlich statistisch signifikant erhöhter (>4,53528%) FoxP3⁺ PBMCs zwischen den untersuchten Patientengruppen.

Schlussfolgerung: Die Daten zeigen erstmalig signifikant erniedrigte Frequenzen von FoxP3⁺ regulatorischen T-Zellen bei PBMCs von DCM- und insbesondere AMC-Patienten. Diese Befunde sind kein Epiphänomen der Herzinsuffizienz, da sich keine signifikanten Unterschiede bei ICM-Patienten mit langjähriger Herzinsuffizienz ischämischer Genese zeigten. Um neue Therapiekonzepte zu schaffen, ist es unabdingbar, genaue Kenntnisse über FoxP3 regulatorische T- Zellen zu erlangen.

6 Literaturverzeichnis

1. Report of the WHO/ISFC task force on the definition and classification of cardiomyopathies. *Br Heart J* 1980; 44 (6):672-3.
2. Richardson P, McKenna W, Bristow M, Maisch B, Mautner B, O'Connell J, Olsen E, Thiene G, Goodwin J, Gyarfás I, Martin I, Nordet P. Report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the Definition and Classification of cardiomyopathies. *Circulation* 1996; 93 (5):841-2.
3. Schultheiss HP, Noutsias M, Kühl U, Lassner D, Gross U, Poller W, Pauschinger M. [Cardiomyopathies. Part I: classification - dilated cardiomyopathy.]. *Internist (Berl)* 2005; 46 (11):1245-58.
4. Schultheiss HP. Dilated Cardiomyopathy - Management, Prognosis and Outcome. In: Camm AJ, Lüscher, T. F., Serruys, P., ed. *The ESC Textbook of Cardiovascular Medicine*: Blackwell Publishing, 2006.
5. D'Ambrosio A, Patti G, Manzoli A, Sinagra G, Di Lenarda A, Silvestri F, Di Sciascio G. The fate of acute myocarditis between spontaneous improvement and evolution to dilated cardiomyopathy: a review. *Heart* 2001; 85 (5):499-504.
6. Why HJ, Meany BT, Richardson PJ, Olsen EG, Bowles NE, Cunningham L, Freeke CA, Archard LC. Clinical and prognostic significance of detection of enteroviral RNA in the myocardium of patients with myocarditis or dilated cardiomyopathy. *Circulation* 1994; 89 (6):2582-9.
7. Fujioka S, Kitaura Y, Ukimura A, Deguchi H, Kawamura K, Isomura T, Suma H, Shimizu A. Evaluation of viral infection in the myocardium of patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2000; 36 (6):1920-6.
8. Kühl U, Pauschinger M, Seeberg B, Lassner D, Noutsias M, Poller W, Schultheiss HP. Viral persistence in the myocardium is associated with progressive cardiac dysfunction. *Circulation* 2005; 112 (13):1965-70.
9. Caforio AL, Calabrese F, Angelini A, Tona F, Vinci A, Bottaro S, Ramondo A, Carturan E, Iliceto S, Thiene G, Daliento L. A prospective study of biopsy-

- proven myocarditis: prognostic relevance of clinical and aetiopathogenetic features at diagnosis. *Eur Heart J* 2007; 28 (11):1326-33.
10. Caforio AL, Mahon NG, Baig MK, Tona F, Murphy RT, Elliott PM, McKenna WJ. Prospective familial assessment in dilated cardiomyopathy: cardiac autoantibodies predict disease development in asymptomatic relatives. *Circulation* 2007; 115 (1):76-83.
 11. Kindermann I, Kindermann M, Kandolf R, Klingel K, Bultmann B, Muller T, Lindinger A, Bohm M. Predictors of outcome in patients with suspected myocarditis. *Circulation* 2008; 118 (6):639-48.
 12. Liu PP, Mason JW. Advances in the understanding of myocarditis. *Circulation* 2001; 104 (9):1076-82.
 13. Noutsias M, Pauschinger M, Poller WC, Schultheiss HP, Kuhl U. Immunomodulatory treatment strategies in inflammatory cardiomyopathy: current status and future perspectives. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2004; 2 (1):37-51.
 14. Heymans S. Myocarditis and heart failure: need for better diagnostic, predictive, and therapeutic tools. *Eur Heart J* 2007; 28 (11):1279-80.
 15. Maul J, Loddenkemper C, Mundt P, Berg E, Giese T, Stallmach A, Zeitz M, Duchmann R. Peripheral and intestinal regulatory CD4+ CD25(high) T cells in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2005; 128 (7):1868-78.
 16. Rieger K, Loddenkemper C, Maul J, Fietz T, Wolff D, Terpe H, Steiner B, Berg E, Miehle S, Bornhauser M, Schneider T, Zeitz M, Stein H, Thiel E, Duchmann R, Uharek L. Mucosal FOXP3+ regulatory T cells are numerically deficient in acute and chronic GvHD. *Blood* 2006; 107 (4):1717-23.
 17. Codd MB, Sugrue DD, Gersh BJ, Melton LJ, 3rd. Epidemiology of idiopathic dilated and hypertrophic cardiomyopathy. A population-based study in Olmsted County, Minnesota, 1975-1984. *Circulation* 1989; 80 (3):564-72.
 18. Olbrich HG. [Epidemiology-etiology of dilated cardiomyopathy]. *Z Kardiol* 2001; 90 Suppl 1 2-9.
 19. Mason JW, O'Connell JB, Herskowitz A, Rose NR, McManus BM, Billingham ME, Moon TE. A clinical trial of immunosuppressive therapy for myocarditis. The Myocarditis Treatment Trial Investigators. *N Engl J Med* 1995; 333 (5):269-75.

20. Taylor DO, Edwards LB, Boucek MM, Trulock EP, Waltz DA, Keck BM, Hertz MI. Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: twenty-third official adult heart transplantation report--2006. *J Heart Lung Transplant* 2006; 25 (8):869-79.
21. Noutsias M, Seeberg B, Schultheiss HP, Kühl U. Expression of cell adhesion molecules in dilated cardiomyopathy: evidence for endothelial activation in inflammatory cardiomyopathy. *Circulation* 1999; 99 (16):2124-31.
22. Kühl U, Pauschinger M, Bock T, Klingel K, Schwimmbeck CP, Seeberg B, Krautwurm L, Noutsias M, Poller W, Schultheiss HP, Kandolf R. Parvovirus B19 infection mimicking acute myocardial infarction. *Circulation* 2003; 108 (8):945-50.
23. Kühl U, Pauschinger M, Noutsias M, Seeberg B, Bock T, Lassner D, Poller W, Kandolf R, Schultheiss HP. High prevalence of viral genomes and multiple viral infections in the myocardium of adults with "idiopathic" left ventricular dysfunction. *Circulation* 2005; 111 (7):887-93.
24. Mahon NG, Madden BP, Caforio AL, Elliott PM, Haven AJ, Keogh BE, Davies MJ, McKenna WJ. Immunohistologic evidence of myocardial disease in apparently healthy relatives of patients with dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2002; 39 (3):455-462.
25. Schoppet M, Maisch B. Alcohol and the heart. *Herz* 2001; 26 (5):345-52.
26. Benjamin RS, Mason JW, Billingham ME. Cardiac toxicity of adriamycin-DNA complex and rubidazone: evaluation by electrocardiogram and endomyocardial biopsy. *Cancer Treat Rep* 1978; 62 (6):935-9.
27. Billingham ME, Bristow MR, Glatstein E, Mason JW, Masek MA, Daniels JR. Adriamycin cardiotoxicity: endomyocardial biopsy evidence of enhancement by irradiation. *Am J Surg Pathol* 1977; 1 (1):17-23.
28. Grogan M, Redfield MM, Bailey KR, Reeder GS, Gersh BJ, Edwards WD, Rodeheffer RJ. Long-term outcome of patients with biopsy-proved myocarditis: comparison with idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 1995; 26 (1):80-4.
29. Schultheiss HP, Noutsias M, Kühl U, Pauschinger M. Myocarditis and Viral Cardiomyopathy. In: Camm AJ, Lüscher, T. F., Serruys, P. W., ed. *The ESC Textbook of Cardiovascular Medicine*: Blackwell Publishing, 2006:Chapter 16.

30. Maisch B, Karatolios K. [New possibilities of diagnostics and therapy of pericarditis.]. *Internist (Berl)* 2008; 49 (1):17-26.
31. Strauer BE, Kandolf R, Mall G, Maisch B, Mertens T, Schwartzkopff B, Schultheiss HP. Myocarditis--cardiomyopathy. Consensus Report of the German Association for Internal Medicine, presented at the 100th annual meeting, Wiesbaden, 13 April 1994. *Acta Cardiol* 1996; 51 (4):347-71.
32. Maisch B, Schonian U, Crombach M, Wendl I, Bethge C, Herzum M, Klein HH. Cytomegalovirus associated inflammatory heart muscle disease. *Scand J Infect Dis Suppl* 1993; 88 135-48.
33. Bowles NE, Richardson PJ, Olsen EG, Archard LC. Detection of Coxsackie-B-virus-specific RNA sequences in myocardial biopsy samples from patients with myocarditis and dilated cardiomyopathy. *Lancet* 1986; 1 (8490):1120-3.
34. Pankuweit S, Moll R, Baandrup U, Portig I, Hufnagel G, Maisch B. Prevalence of the parvovirus B19 genome in endomyocardial biopsy specimens. *Hum Pathol* 2003; 34 (5):497-503.
35. Okabe M, Fukuda K, Arakawa K, Kikuchi M. Chronic variant of myocarditis associated with hepatitis C virus infection. *Circulation* 1997; 96 (1):22-4.
36. Matsumori A, Matoba Y, Sasayama S. Dilated cardiomyopathy associated with hepatitis C virus infection. *Circulation* 1995; 92 (9):2519-25.
37. Herskowitz A, Willoughby S, Wu TC, Beschoner WE, Neumann DA, Rose NR, Baughman KL, Ansari AA. Immunopathogenesis of HIV-1-associated cardiomyopathy. *Clin Immunol Immunopathol* 1993; 68 (2):234-41.
38. Angelini A, Calzolari V, Calabrese F, Boffa GM, Maddalena F, Chioin R, Thiene G. Myocarditis mimicking acute myocardial infarction: role of endomyocardial biopsy in the differential diagnosis. *Heart* 2000; 84 (3):245-50.
39. Noutsias M, Pauschinger M, Schultheiss HP, Kühl U. Advances in the immunohistological diagnosis of inflammatory cardiomyopathy. *Eur Heart J* 2002; Supplement 4 (I):I54-I62.
40. Klingel K, Stephan S, Sauter M, Zell R, McManus BM, Bultmann B, Kandolf R. Pathogenesis of murine enterovirus myocarditis: virus dissemination and immune cell targets. *J Virol* 1996; 70 (12):8888-95.
41. Bergelson JM, Cunningham JA, Droguett G, Kurt-Jones EA, Krithivas A, Hong JS, Horwitz MS, Crowell RL, Finberg RW. Isolation of a common receptor for

- Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science* 1997; 275 (5304):1320-3.
42. Noutsias M, Fechner H, de Jonge H, Wang X, Dekkers D, Houtsmuller AB, Pauschinger M, Bergelson J, Warraich R, Yacoub M, Hetzer R, Lamers J, Schultheiss HP, Poller W. 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 (3):275-80.
43. Dec GW, Jr., Palacios IF, Fallon JT, Aretz HT, Mills J, Lee DC, Johnson RA. Active myocarditis in the spectrum of acute dilated cardiomyopathies. Clinical features, histologic correlates, and clinical outcome. *N Engl J Med* 1985; 312 (14):885-90.
44. Noutsias M, Pauschinger M, Poller WC, Schultheiss HP, Kühl U. Current insights into the pathogenesis, diagnosis and therapy of inflammatory cardiomyopathy. *Heart Fail Monit* 2003; 3 (4):127-35.
45. Baughman KL. Diagnosis of myocarditis: death of Dallas criteria. *Circulation* 2006; 113 (4):593-5.
46. Cooper LT, Baughman KL, Feldman AM, Frustaci A, Jessup M, Kühl U, Levine GN, Narula J, Starling RC, Towbin J, Virmani R. The role of endomyocardial biopsy in the management of cardiovascular disease: a scientific statement from the American Heart Association, the American College of Cardiology, and the European Society of Cardiology. *Circulation* 2007; 116 (19):2216-33.
47. Maisch B, Alter P, Karatolios K, Ruppert V, Pankuweit S. [The heart in cases of viral, bacterial and parasitic infections]. *Internist (Berl)* 2007; 48 (3):255-67.
48. Sakakibara S, Konno S. Endomyocardial biopsy. *Jpn Heart J* 1962; 3 537-43.
49. Holzmann M, Nicko A, Kühl U, Noutsias M, Poller W, Hoffmann W, Morguet A, Witzenbichler B, Tschöpe C, Schultheiss HP, Pauschinger M. Complication rate of right ventricular endomyocardial biopsy via the femoral approach: a retrospective and prospective study analyzing 3048 diagnostic procedures over an 11-year period. *Circulation* 2008; 118 (17):1722-8.
50. Aretz HT. Myocarditis: the Dallas criteria. *Hum Pathol* 1987; 18 (6):619-24.
51. Noutsias M, Pauschinger M, Schultheiß HP, Kühl U. Diagnosis, Etiopathogenic Differentiation and Immunomodulatory Treatment of

- Inflammatory Cardiomyopathy. In: Columbus F, ed. Progress in Inflammation Research. Vol. 2. New York: Nova Science Publishers, 2004.
52. Hauck AJ, Kearney DL, Edwards WD. Evaluation of postmortem endomyocardial biopsy specimens from 38 patients with lymphocytic myocarditis: implications for role of sampling error. *Mayo Clin Proc* 1989; 64 (10):1235-45.
53. Shanes JG, Ghali J, Billingham ME, Ferrans VJ, Fenoglio JJ, Edwards WD, Tsai CC, Saffitz JE, Isner J, Furner S. Interobserver variability in the pathologic interpretation of endomyocardial biopsy results. *Circulation* 1987; 75 (2):401-5.
54. Strauer BE, Kandolf R, Mall G, Maisch B, Mertens T, Figulla HR, Schwartzkopff B, Brehm M, Schultheiss HP. [Update 2001. Myocarditis--cardiomyopathy]. *Med Klin (Munich)* 2001; 96 (10):608-25.
55. Cooper LT, Virmani R, Chapman NM, Frustaci A, Rodeheffer RJ, Cunningham MW, McNamara DM. National Institutes of Health-sponsored workshop on inflammation and immunity in dilated cardiomyopathy. *Mayo Clin Proc* 2006; 81 (2):199-204.
56. Kühl U, Noutsias M, Seeberg B, Schultheiss HP. Immunohistological evidence for a chronic intramyocardial inflammatory process in dilated cardiomyopathy. *Heart* 1996; 75 (3):295-300.
57. Wojnicz R, Nowalany-Kozielska E, Wojciechowska C, Glanowska G, Wilczewski P, Niklewski T, Zembala M, Polonski L, Rozek MM, Wodniecki J. Randomized, placebo-controlled study for immunosuppressive treatment of inflammatory dilated cardiomyopathy: two-year follow-up results. *Circulation* 2001; 104 (1):39-45.
58. Vallbracht KB, Schwimmbeck PL, Seeberg B, Kühl U, Schultheiss HP. Endothelial dysfunction of peripheral arteries in patients with immunohistologically confirmed myocardial inflammation correlates with endothelial expression of human leukocyte antigens and adhesion molecules in myocardial biopsies. *J Am Coll Cardiol* 2002; 40 (3):515-20.
59. Noutsias M, Pauschinger M, Ostermann K, Escher F, Blohm JH, Schultheiss H, Kühl U. Digital image analysis system for the quantification of infiltrates and cell adhesion molecules in inflammatory cardiomyopathy. *Med Sci Monit* 2002; 8 (5):MT59-71.

60. Noutsias M, Hohmann C, Pauschinger M, Schwimmbeck PL, Ostermann K, Rode U, Yacoub MH, Kühl U, Schultheiss HP. sICAM-1 correlates with myocardial ICAM-1 expression in dilated cardiomyopathy. *Int J Cardiol* 2003; 91 (2-3):153-61.
61. Noutsias M, Pauschinger M, Schultheiss H, Kühl U. Phenotypic characterization of infiltrates in dilated cardiomyopathy - diagnostic significance of T-lymphocytes and macrophages in inflammatory cardiomyopathy. *Med Sci Monit* 2002; 8 (7):CR478-87.
62. Noutsias M, Pauschinger M, Schultheiss HP, Kühl U. Cytotoxic perforin+ and TIA-1+ infiltrates are associated with cell adhesion molecule expression in dilated cardiomyopathy. *Eur J Heart Fail* 2003; 5 (4):469-79.
63. Hunt SA, Abraham WT, Chin MH, Feldman AM, Francis GS, Ganiats TG, Jessup M, Konstam MA, Mancini DM, Michl K, Oates JA, Rahko PS, Silver MA, Stevenson LW, Yancy CW, Antman EM, Smith SC, Jr., Adams CD, Anderson JL, Faxon DP, Fuster V, Halperin JL, Hiratzka LF, Jacobs AK, Nishimura R, Ornato JP, Page RL, Riegel B. ACC/AHA 2005 Guideline Update for the Diagnosis and Management of Chronic Heart Failure in the Adult: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Update the 2001 Guidelines for the Evaluation and Management of Heart Failure): developed in collaboration with the American College of Chest Physicians and the International Society for Heart and Lung Transplantation: endorsed by the Heart Rhythm Society. *Circulation* 2005; 112 (12):e154-235.
64. Kühl U, Schultheiss HP. Treatment of chronic myocarditis with corticosteroids. *Eur Heart J* 1995; 16 (Suppl O):168-72.
65. Frustaci A, Chimenti C, Calabrese F, Pieroni M, Thiene G, Maseri A. Immunosuppressive therapy for active lymphocytic myocarditis: virological and immunologic profile of responders versus nonresponders. *Circulation* 2003; 107 (6):857-63.
66. Kühl U, Pauschinger M, Schwimmbeck PL, Seeberg B, Lober C, Noutsias M, Poller W, Schultheiss HP. Interferon-beta treatment eliminates cardiotropic viruses and improves left ventricular function in patients with myocardial persistence of viral genomes and left ventricular dysfunction. *Circulation* 2003; 107 (22):2793-8.

67. Coletta AP, Clark AL, Cleland JG. Clinical trials update from the Heart Failure Society of America and the American Heart Association meetings in 2008: SAdhart-chf, compare, Momentumid hormone analogue study, HF-ACTION, I-PRESERVE, {beta}-interferon study, BACH, and ATHENA. *Eur J Heart Fail* 2009; 11 (2):214-9.
68. Hufnagel G, Pankuweit S, Richter A, Schonian U, Maisch B. The European Study of Epidemiology and Treatment of Cardiac Inflammatory Diseases (ESETCID). First epidemiological results. *Herz* 2000; 25 (3):279-85.
69. von Herrath MG, Harrison LC. Antigen-induced regulatory T cells in autoimmunity. *Nat Rev Immunol* 2003; 3 (3):223-32.
70. Shevach EM, McHugh RS, Thornton AM, Piccirillo C, Natarajan K, Margulies DH. Control of autoimmunity by regulatory T cells. *Adv Exp Med Biol* 2001; 490 21-32.
71. Tao R, Hancock WW. Regulating regulatory T cells to achieve transplant tolerance. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2007; 6 (4):348-57.
72. Bach JF. Regulatory T cells under scrutiny. *Nat Rev Immunol* 2003; 3 (3):189-98.
73. Kriegel MA, Lohmann T, Gabler C, Blank N, Kalden JR, Lorenz HM. Defective suppressor function of human CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells in autoimmune polyglandular syndrome type II. *J Exp Med* 2004; 199 (9):1285-91.
74. Yamazaki S, Iyoda T, Tarbell K, Olson K, Velinzon K, Inaba K, Steinman RM. Direct expansion of functional CD25⁺ CD4⁺ regulatory T cells by antigen-processing dendritic cells. *J Exp Med* 2003; 198 (2):235-47.
75. Misra N, Bayry J, Lacroix-Desmazes S, Kazatchkine MD, Kaveri SV. Cutting edge: human CD4⁺CD25⁺ T cells restrain the maturation and antigen-presenting function of dendritic cells. *J Immunol* 2004; 172 (8):4676-80.
76. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Nat Immunol* 2003; 4 (4):330-6.
77. Ramsdell F. Foxp3 and natural regulatory T cells: key to a cell lineage? *Immunity* 2003; 19 (2):165-8.
78. Vieira PL, Christensen JR, Minaee S, O'Neill EJ, Barrat FJ, Boonstra A, Barthlott T, Stockinger B, Wraith DC, O'Garra A. IL-10-secreting regulatory T cells do not express Foxp3 but have comparable regulatory function to

- naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol* 2004; 172 (10):5986-93.
79. Ochs HD, Ziegler SF, Torgerson TR. FOXP3 acts as a rheostat of the immune response. *Immunol Rev* 2005; 203 156-64.
80. Baecher-Allan C, Brown JA, Freeman GJ, Hafler DA. CD4+CD25high regulatory cells in human peripheral blood. *J Immunol* 2001; 167 (3):1245-53.
81. Apostolou I, von Boehmer H. In vivo instruction of suppressor commitment in naive T cells. *J Exp Med* 2004; 199 (10):1401-8.
82. Walker MR, Kasprowitz DJ, Gersuk VH, Benard A, Van Landeghen M, Buckner JH, Ziegler SF. Induction of FoxP3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4+CD25- T cells. *J Clin Invest* 2003; 112 (9):1437-43.
83. Balandina A, Lecart S, Dartevelle P, Saoudi A, Berrih-Aknin S. Functional defect of regulatory CD4(+)CD25+ T cells in the thymus of patients with autoimmune myasthenia gravis. *Blood* 2005; 105 (2):735-41.
84. Fontenot JD, Rudensky AY. A well adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3. *Nat Immunol* 2005; 6 (4):331-7.
85. Lehmann OJ, Sowden JC, Carlsson P, Jordan T, Bhattacharya SS. Fox's in development and disease. *Trends Genet* 2003; 19 (6):339-44.
86. Lindley S, Dayan CM, Bishop A, Roep BO, Peakman M, Tree TI. Defective suppressor function in CD4(+)CD25(+) T-cells from patients with type 1 diabetes. *Diabetes* 2005; 54 (1):92-9.
87. Maloy KJ, Powrie F. Regulatory T cells in the control of immune pathology. *Nat Immunol* 2001; 2 (9):816-22.
88. Marshall NA, Christie LE, Munro LR, Culligan DJ, Johnston PW, Barker RN, Vickers MA. Immunosuppressive regulatory T cells are abundant in the reactive lymphocytes of Hodgkin lymphoma. *Blood* 2004; 103 (5):1755-62.
89. Sakaguchi S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol* 2005; 6 (4):345-52.
90. Sugiyama H, Gyulai R, Toichi E, Garaczi E, Shimada S, Stevens SR, McCormick TS, Cooper KD. Dysfunctional blood and target tissue CD4+CD25high regulatory T cells in psoriasis: mechanism underlying

- unrestrained pathogenic effector T cell proliferation. *J Immunol* 2005; 174 (1):164-73.
91. Viguiier M, Lemaitre F, Verola O, Cho MS, Gorochov G, Dubertret L, Bachelez H, Kourilsky P, Ferradini L. Foxp3 expressing CD4+CD25(high) regulatory T cells are overrepresented in human metastatic melanoma lymph nodes and inhibit the function of infiltrating T cells. *J Immunol* 2004; 173 (2):1444-53.
92. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 1995; 155 (3):1151-64.
93. Vigiuetta V, Baecher-Allan C, Weiner HL, Hafler DA. Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J Exp Med* 2004; 199 (7):971-9.
94. Kasprawicz DJ, Smallwood PS, Tyznik AJ, Ziegler SF. Scurfin (FoxP3) controls T-dependent immune responses in vivo through regulation of CD4(+) T cell effector function. *J Immunol* 2003; 171 (3):1216-23.
95. Sanjeev M, Monack D. Inflammasome adaptors and sensors: intracellular regulators of infection and inflammation. *Nature Reviews Immunology* 2007; 7: 31-40.
96. Martinelli C, Reichhart JM: Evolution and integration of innate immune systems from fruit flies to man: lessons and questions. *J Endotoxin Res.* 2005; 11(4): 243-248.
97. Borghans JA, Noest AJ, De Boer RJ: How Specific Should Immunological Memory Be?. *The Journal of Immunology* 1999; 163: 569-575.
98. Thornton AM, Piccirillo CA, Shevach EM.: Activation requirements for the induction of CD4+CD25+ T cell suppressor function. *Eur J Immunol.* 2004 Feb;34(2):366-76.
99. Kasprawicz DJ, Smallwood PS, Tyznik AJ, Ziegler SF. Scurfin (FoxP3) controls T-dependent immune responses in vivo through regulation of CD4(+) T cell effector function. *J Immunol* 2003; 171 (3):1216-23.
100. Torgerson TR, Ochs HD. Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked: forkhead box protein 3 mutations and lack of regulatory T cells. *J Allergy Clin Immunol.* Oct 2007;120(4):744-750.

101. Schreiber, T. H. (2007): The Use of FoxP3 as a Biomarker and Prognostic Factor for Malignant Human Tumors. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007;16(10):1931–4.
102. Gavin, M.A., Torgerson, T., Houston, E., deRoos, P., Ho, W.Y. . (2006): Single-cell analysis of normal and FOXP3-mutant human T cells: FOXP3 expression without regulatory T cell development *Proc Natl Acad Sci U S A* 103,. S. 6659-6664.
103. Simova J, Bubenik J, Bieblova J, Rosalia RA, Fric J, Reinis M. Depletion of T(reg) cells inhibits minimal residual disease after surgery of HPV16-associated tumours. *Int J Oncol.* 2006 Dec;29(6):1567-71.
104. Kohm AP, McMahon JS, Podojil JR. Cutting Edge: Anti-CD25 monoclonal antibody injection results in the functional inactivation, not depletion, of CD4+CD25+ T regulatory cells. *J Immunol.* 2006 Mar 15;176(6):3301-5.
105. Markus Feuerer, Jonathan A Hill, Diane Mathis & Christophe Benoist Foxp3⁺ regulatory T cells: differentiation, specification, subphenotypes. *Nature Immunology* 2009 ;10, 689 - 695 .

7 Abkürzungsverzeichnis

AMC	akute Myokarditis
AMC-AMI	akute Myokarditis mit einer klinischen Präsentation die einem akuten Myokardinfarkt ähnelt
AMC-DLVF	akute Myokarditis mit eingeschränkter LVEF (<i>depressed left ventricular function</i>)
AV-Block	atrioventrikulärer Block
CAR	Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor
CTLs	Zytotoxische T-Lymphozyten
DCM	Dilatative Kardiomyopathie
DBA	Digitale Bildanalyse
EF	Ejektionsfraktion
EMBs	Endomyokardbiopsien
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i>
DCMi	inflammatorische Kardiomyopathie
ICM	ischämische Kardiomyopathie
IPEX	Immun-Dysregulation, Polyendokrinopathie, X-chromosomale Enteropathie
LVEF	Linksventrikuläre Ejektionsfraktion
LVESD	Linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser
nPCR:	<i>nested polymerase chain reaction</i> (Polymerasenkettenreaktion)
NYHA	New York Heart Association
PBMC	peripheral blood mononuclear cells
PCR	Polymerasenkettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
TCR	T-Zell-Rezeptor
Tregs	regulatorische T-Zellen

8 Danksagung

Mein Dank richtet sich an erster Stelle an meine Eltern und meine Schwester, die mich immer unterstützt haben und ohne die vieles nicht möglich gewesen wäre.

Ich danke Herrn Professor Dr. Heinz-Peter Schultheiss (Direktor, CharitéCentrum 11 für Herz-, Kreislauf- und Gefäßmedizin, Campus Benjamin Franklin; Sprecher des SFB TR19) für die Bereitstellung des Themas sowie die freundliche Zusammenarbeit und Betreuung.

Für die kollegiale und freudige Zusammenarbeit sowie für die zahlreichen Hilfestellungen und Ratschläge bei der Durchführung und Auswertung der FACS-Analyse gilt mein Dank Fr. Dipl.-Ing. Andrea Block.

Herrn PD Dr. Stefan Schwarz (Charité Centrum 14, Klinik für Hämatologie und Onkologie, Campus Benjamin Franklin) möchte ich für den Zugang zu dem FACS Gerät herzlich danken.

Insbesondere danke ich auch Frau Dr. med. Rebecca Tschöpe für Ihre Durchsetzungsfähigkeit sowie Prof. Dr. Tschöpe für die finalen Korrekturen.

Masyar, Dir herzlichen Dank dass Du den Fortschritt initiiert und nötige Impulse verliehen hast.

Danke auch an Julia, Olli und Laura; ohne Euch wäre das Leben nur halb so schön.

9 Lebenslauf

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

10 Selbständigkeitserklärung

Erklärung an Eides Statt

Hiermit erkläre ich, Yvonne Stechling, an Eides Statt, dass die vorgelegte Dissertation von mir selbst und ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfasst wurde, auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt und die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur vollständig angegeben sind.

Berlin, den 29.06.2010

Yvonne Stechling