

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

DISSERTATION

*Einfluss der selektiven Mineralokortikoid-Rezeptor-Blockade
(Eplerenon) in einem murinen Virusmyokarditismodell*

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Robert Arndt

aus Lutherstadt Wittenberg

Datum der Promotion: 06.03.2020

Vorwort

Teile der vorliegenden Arbeit wurden im Rahmen einer Poster-Präsentation präsentiert:

Sebastian Jäger, Alexander Riad, Robert Arndt, Susanne Rutschow, Kerstin Puhl, Heinz-Peter Schultheiss, Carsten Tschöpe und Matthias Pauschinger
Therapie mit Eplerenone verringert die kardiale Fibrose und verbessert die linksventrikuläre Dysfunktion im murinen CVB-3 Myokarditis Modell.
Clin Res Cardiol 2007 V1429

Im Rahmen jener Poster-Präsentation wurde ein erster Teil der Ergebnisse dieser Dissertation präsentiert. Es handelte sich um die Ergebnisse der immunhistologischen Bestimmung des Gesamtkollagens (Ermittlung mittels Sirius Red-Färbung) und der hämodynamisch bestimmten Parameter: Herzzeitvolumen, linksventrikulärer endsystolischer Druck und linksventrikuläre maximale Druckabfallsgeschwindigkeit für die Tiere der 28 Therapietage-Gruppen.

Abkürzungsverzeichnis	IV
Zusammenfassung	1
Abstract.....	3
1 Einleitung	4
1.1 Myokarditis und inflammatorische Kardiomyopathie	4
1.2 Ätiologie	5
1.3 Virale Myokarditis.....	6
1.3.1 Krankheitsverlauf der viralen Myokarditis	6
1.3.2 Coxsackievirus-induzierte Myokarditis.....	7
1.4 Rolle des Immunsystems bei der CVB3-induzierten Myokarditis	10
1.5 Myokardiales Remodeling und dessen Einfluss auf die myokarditische Pathogenese.....	15
1.5.1 Extrazelluläre Matrix (EZM)	16
1.5.2 Matrix-Metalloproteasen (MMPs) und Tissue Inhibitor of Metalloproteases (TIMPs).....	16
1.5.3 Kardiales Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS).....	17
1.6 Fragestellungen dieser Arbeit	19
2 Material und Methodik.....	21
2.1 Studiendesign	21
2.1.1 Das Virus.....	21
2.1.2 Die Versuchstiere und die Versuchsbedingungen	22
2.1.3 Medikament und Plazebo	22
2.1.4 Gruppeneinteilung	22
2.1.5 Versuchsablauf.....	23
2.2 Hämodynamische Untersuchungen	24
2.3 Gewinnung und Konservierung der Proben	27
2.4 RNA-Transkriptionsanalysen.....	27
2.4.1 Extraktion und Reinigung der RNA.....	27
2.4.2 Reverse Transkription	29

2.4.3	Quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (qPCR)	29
2.4.4	Bestimmung der Viruslast.....	31
2.5	Aktivitätsbestimmung von MMP-2 und MMP-9 mittels Zymographie	32
2.5.1	Proteinextraktion und -quantifizierung	32
2.5.2	Zymographie.....	33
2.6	Histochemische und Immunhistochemische Untersuchungen	34
2.6.1	Anfertigung von Paraffin- und Gefrierschnitten.....	35
2.6.2	Sirius Red-Färbung zur Bestimmung des Gesamtkollagengehaltes.....	35
2.6.3	Nachweis apoptotischer Zellen mittels TUNEL-Färbung	36
2.6.4	Immunhistochemische Färbungen.....	37
2.6.4.1	Durchführung der einfachen indirekten Methode	37
2.6.4.1	Durchführung der ABC-Methode.....	38
2.6.4.1	Durchführung der Polymer-Methode.....	39
2.6.4.2	Enzymatisches Detektionssystem.....	41
2.6.5	Auswertung der histo- und immunhistochemischen Färbungen	41
2.7	Statistik	42
3	Ergebnisse	47
3.1	Morbidität und Mortalität.....	47
3.2	Hämodynamische Funktion.....	49
3.3	Histologische und molekularbiologische Veränderungen des Myokards.....	53
3.3.1	Myokardiales Entzündungsgeschehen	53
3.3.1.1	Myokardiale Expression von Zytokinen.....	53
3.3.1.2	Expression von Zelladhäsionsmolekülen	54
3.3.1.3	Infiltration von Leukozyten	55
3.3.1.4	Bildung reaktiver Stickstoffspezies.....	60
3.3.1.5	CVB3-Virusreplikation.....	61
3.3.2	Myokardiale Apoptoserate.....	61
3.3.3	Myokardiales Remodeling	62
3.3.3.1	MMPs und TIMPs	62
3.3.3.2	Kollagen-Synthese und Fibrose.....	66
3.3.3.3	Matrizelluläres Protein CCN 2/ CTGF	71

4 Diskussion	72
4.1 Selektive MR-Blockade beeinflusst Morbidität, aber nicht Mortalität	72
4.2 Selektive MR-Blockade reduziert die kardiale Dysfunktion	73
4.3 Histologische und molekularbiologische Veränderungen nach selektiver MR-Blockade.....	76
4.3.1 Selektive MR-Blockade reduziert die myokardiale Entzündungsreaktion ..	76
4.3.1.1 Selektive MR-Blockade modifiziert die myokardiale Zytokinexpression nicht signifikant	77
4.3.1.2 Selektive MR-Blockade reduziert die Expression des Zelladhäsionsmoleküls ICAM-1.....	77
4.3.1.3 Selektive MR-Blockade reduziert die Infiltration von CD11b-positiven Immunzellen.....	78
4.3.1.4 Selektive MR-Blockade reduziert den nitrosaktiven Stress	81
4.3.1.5 Selektive MR-Blockade hat keinen Effekt auf die Viruselimination	82
4.3.2 Selektive MR-Blockade reduziert die myokardiale Apoptoserate	82
4.3.3 Selektive MR-Blockade reduziert das myokardiale Remodeling.....	83
4.3.3.1 Selektive MR-Blockade reduziert die Aktivität des MMP/TIMP-Systems	84
4.3.3.2 Selektive MR-Blockade reduziert die myokardiale Kollagen-Synthese und Fibrosierung.....	88
4.3.3.3 Selektive MR-Blockade reduziert die Expression des matrizelluläres Protein CCN 2.....	89
4.4 Methodenkritik und Studienlimitation.....	90
Literaturverzeichnis	95
Abbildungsverzeichnis	119
Tabellenverzeichnis	121
Eidesstattliche Versicherung	VIII
Lebenslauf	IX
Publikationen.....	X
Danksagung.....	XII

Abkürzungsverzeichnis

a	dimensionslose Konstante für die Konduktanzmessung
ABC	Avidin-Biotin-Komplex (<i>avidin-biotin-complex</i>)
ACE	Angiotensin-konvertierendes Enzym (<i>angiotensin-converting-enzym</i>)
AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
AHA	<i>American Heart Association</i>
ANP	atriales natriuretisches Peptid
APC	Antigen-präsentierenden Zellen (<i>antigen-presenting cells</i>)
BCA	Bicinchoninsäure
CAR	Coxsackievirus-Adenovirus-Rezeptor
CCN	<i>Cystein-rich-angiogenetic-inducer-61</i> , <i>Connective-tissue-growth-factor</i> und <i>Nephroblastoma overexpressed</i> -Familie
CD	Unterscheidungsgruppen (<i>cluster-of-differentiation</i>)
CDKN 1B	Cyclin-abhängige-Kinase-Inhibitor 1B (<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 1 B</i>)
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure (<i>complementary deoxyribonucleic acid</i>)
CMV	Cytomegalie-Virus
CO	Kontrolltiere
C_t	Schwellenwertzyklus (<i>threshold-cycle</i>)
CTGF	Bindegewebswachstumsfaktor (<i>connective tissue growth factor</i>)
CVB3	Coxsackievirus B3
CVB+	Coxsackievirus B3-infizierte Tiere
DAF	Zerfall-beschleunigender Faktor (<i>decay accelerating factor</i>)
DCM	dilatative Kardiomyopathie
DE	Deutschland
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Nukleosidtriphosphate
dP/dt_{\max}	Kontraktilität (maximale Druckerhöhungsgeschwindigkeit)
dP/dt_{\min}	Relaxation (maximale Druckabfallsgeschwindigkeit)
dUTP	Desoxyuridintriphosphat

E+	mit Eplerenon behandelte Tiere
EBV	Epstein-Barr-Virus
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
ERK 1/2	<i>Extracellular signal regulated kinases 1/2</i>
Ez	relative Expression des Zielgens
EZM	Extrazelluläre Matrix
F	<i>French</i>
FEM	Forschungseinrichtung für experimentelle Medizin
FKS	fetales Kälber-Serum
G	<i>Gauge</i>
G(t)	Konduktanz in Anhängigkeit von der Zeit
HAV	Hepatitis-A-Virus
HCV	Hepatitis-C-Virus
HeLa-Zellen	Humane Zelllinie aus Epithelzellen eines Zervixkarzinoms der Patientin Henrietta Lacks aus den 1950er Jahren
HF	Herzfrequenz
HHV-6	Humanes Herpesvirus 6
HIV	Humanes Immundefizienz- Virus
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
HSV-1	Herpes simplex-Virus 1
HZV	Herzzeitvolumen
ICAM-1	interzelluläres Adhäsionsmolekül-1 (<i>intercellular adhesion molecule-1</i>)
IL	Interleukin
INF	Interferon
iNO-Synthase	induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase (<i>inducible nitric oxide synthase</i>)
ISFC	Internationale Gesellschaft und Föderation für Kardiologie (<i>International Society and Federation of Cardiology</i>)
KG	Körpergewicht
L	Abstand zwischen den Konduktanz-Elektroden
LVEDD	linksventrikulärer enddiastolischer Druck
LVEDV	linksventrikuläres enddiastolisches Volumen
LVEF	linksventrikuläre Ejektionsfraktion

LVESV	linksventrikuläres endsystolisches Volumen
LVP	linksventrikulärer systolischer Druck
MHC	Haupt-Histo-Kompatibilitätskomplex (<i>major histocompatibility complex</i>)
M	Molar (Mol/Liter)
MMP	Matrix-Metalloprotease
MR	Mineralokortikoidrezeptor
mRNA	Boten-(<i>messenger</i> -)Ribonukleinsäure
MT-MMP	membrangebundene-(<i>membrane-type</i> -) Matrixmetalloprotease
MW	Mittelwert
n	Anzahl
NF κ B	nuklearer Faktor κ B (<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>)
NIH	Nationale Gesundheitsinstitute der USA (<i>US National Institutes of Health</i>)
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NO	Stickstoffmonoxid
NSTEMI	Nicht-ST-Streckenhebungsinfarkt
NYHA	<i>New-York-Heart-Association</i>
p.i.	nach der Infektion (<i>post infectionem</i>)
PAMPs	pathogen-assoziierte molekulare Muster (<i>pathogen-associated molecular patterns</i>)
PBS	Phosphat-gepufferte-Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PFU	Plaques-bildende Einheit (<i>plaque forming unit</i>)
PRR	Pathogen-Erkennungsrezeptor (<i>pathogen recognition receptors</i>)
qPCR	quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (<i>real-time quantitative PCR</i>)
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RIPA	Radioimmunpräzipitationstest (<i>radioimmunoprecipitation assay</i>)
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RS-Virus	Respiratorisches Synzytial-Virus
RT-qPCR	reverse Transkription mit konsekutiver quantitativer Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (<i>reverse transcription quantitative PCR</i>)

SAP	systolischer arterieller Blutdruck (<i>systolic arterial pressure</i>)
SDS	Natirumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SDS-PAGE	Natirumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
SEM	Standardfehler des Mittelwertes (<i>standard error of mean</i>)
SLE	Systemischer Lupus erythematodes
sp.	Spezies
ss(+)RNA	Ribonukleinsäure-Einzelstrang mit positiver Polarität
SSC	Natrium-Citrat-Puffer (<i>standard saline citrate</i>)
STEMI	ST-Streckenhebungsinfarkt
SV	linksventrikuläres Schlagvolumen
t	Zeit
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung (<i>tris buffered saline</i>)
TdT	terminale Desoxynucleotidyltransferase
TGF- β	Transformierender Wachstumsfaktor- β (<i>transforming-growth-factor-β</i>)
T _H 1-Zellen	Typ 1-T-Helferzellen
T _H 2-Zellen	Typ 2-T-Helferzellen
T _H 17-Zellen	Typ 17-T-Helferzellen
TIMP	Gewebeinhibitor von Metalloproteasen (<i>tissue inhibitor of metalloproteases</i>)
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor- α
TUNEL	<i>terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin Nick-End Labeling</i>
V(c)	Korrekturvolumen
VCAM-1	vaskuläres Zelladhäsionsmolekül-1 (<i>vascular cell adhesion molecule-1</i>)
V(t)	Volumen in Anhängigkeit von der Zeit
VZV	Varizella-Zoster-Virus
WHO	Weltgesundheitsorganisation (<i>World Health Organisation</i>)
σ	Leitfähigkeit des Blutes

Zusammenfassung

Einleitung Die Virusmyokarditis ist eine der häufigsten Ursachen für die Entwicklung einer Herzinsuffizienz oder das Erleiden eines plötzlichen Herztods bei jungen Erwachsenen. Wichtig für die Pathogenese sind myokardiale Entzündungsreaktionen, Apoptose und Remodeling. Verschiedene Untersuchungen konnten eine Beeinflussung dieser Prozesse durch erhöhte Aldosteron-Gewebekonzentrationen nachweisen. Studien an Herzinfarktpatienten zeigten eine Reduktion der Herzinsuffizienzentwicklung durch einen selektiven Mineralokortikoidrezeptor (MR)-Antagonismus. Die vorliegende Arbeit untersucht den Einfluss einer selektiven MR-Blockade in einem murinen Virusmyokarditis-Modell.

Material und Methoden Die SWR/J-Mäuse wurden mit dem Coxsackievirus B3 (CVB3) infiziert und entwickelten eine Myokarditis. Eine Kontrollgruppe wurde scheininfiziert. Die Tiere wurden anschließend täglich mit dem selektiven MR-Antagonisten Eplerenon oder Plazebo behandelt. Nach 8 bzw. 28 Tagen wurde die kardiale Hämodynamik mittels Konduktanzkatheter untersucht. Anschließend wurden Entzündungsreaktion, Apoptoserate und myokardiales Remodeling mittels Zymographie, histochemischer sowie immunhistochemischer Untersuchungen und reverser Transkription mit konsekutiver quantitativer Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (RT-qPCR) analysiert.

Ergebnisse Die CVB3-infizierten Tiere entwickelten eine zeitlich progrediente linksventrikuläre Dilatation und Dysfunktion. Sie zeigten vor allem am 8. Versuchstag eine ausgeprägte myokardiale Entzündungsreaktion, erhöhte Apoptoserate und ein gesteigertes myokardiales Remodeling.

Verglichen mit der Plazebo-Therapie reduzierte der selektive MR-Antagonismus signifikant die Entwicklung der linksventrikulären Dilatation und Dysfunktion nach 8 und ausgeprägter nach 28 Therapietagen. Auch eine signifikante Reduktion der myokardialen Entzündungsreaktion war nachweisbar. Sie war deutlich nach 8 Tagen und geringer nach 28 Versuchstagen ausgeprägt. Ebenso war Apoptoserate nach 8-tägiger selektiver MR-Blockade im Vergleich zur Plazebo-Therapie vermindert. Das myokardiale Remodeling wurde ebenfalls positiv beeinflusst. Die Aktivität des Matrixmetalloproteasen (MMP)/ *Tissue Inhibitors of Metalloproteases* (TIMP)-Systems war hauptsächlich nach 8 und der Anstieg des Kollagen I- und Gesamtkollagengehaltes waren vor allem nach 28 Therapietagen signifikant geringer.

Schlussfolgerung Der selektive MR-Antagonismus verringert in einem CVB3-induzierten murinen Myokarditis-Modell die myokardiale Entzündungsreaktion, die Apoptoserate und das myokardiale Remodeling. Hierdurch werden die Entwicklung einer linksventrikulären Dilatation und Dysfunktion reduziert.

Abstract

Background Viral myocarditis is a common cause of congestive heart failure and sudden cardiac death in young adults. Myocardial inflammation, apoptosis and remodeling are important for its pathogenesis. Various examinations have shown that these processes can be influenced by elevated aldosterone levels. Studies of patients with myocardial infarction revealed a reduced progression of congestive heart failure by selective mineralocorticoid receptor (MR) antagonism. Therefore this study investigates the influence of selective MR blockade in a murine viral myocarditis model.

Material and methods SWR/J mice were infected with Coxsackievirus B3 (CVB3) to establish a viral myocarditis. A control group was sham infected. Half of the animals were treated with the selective MR antagonist eplerenone or placebo daily. Cardiac hemodynamic was measured after 8 and 28 treatment days by conductance catheter technique. Subsequently, myocardial inflammation, apoptosis and remodeling were analyzed by zymography, reverse transcription quantitative real-time polymerase chain reaction (RT-qPCR), histochemistry and immunohistochemistry.

Results With increasing time post infection CVB3-infected mice developed a left ventricular dilation and dysfunction. They developed a marked myocardial inflammation, increased apoptosis and aggravated myocardial remodeling 8 days after infection. Treatment with selective MR antagonist reduced the development of left ventricular dilation and dysfunction after 8, but especially after 28 treatment days. Myocardial inflammation was significantly decreased. Its diminution was noticeably detectable after 8 but hardly after 28 treatment days. Myocardial apoptosis was reduced after 8 treatment days. Myocardial remodeling was positively influenced as well. Activation of matrix-metalloprotease (MMP)/tissue inhibitor of metalloproteases (TIMP) system was preeminently reduced after 8 treatment days. Collagen I and total collagen decreased in particular after 28 treatment days.

Conclusion By reducing myocardial inflammation, apoptosis and affecting myocardial remodeling positively selective MR antagonism reduced formation of left ventricular dilatation and dysfunction in a CVB3-induced murine myocarditis model.

1 Einleitung

1.1 Myokarditis und inflammatorische Kardiomyopathie

Bereits im Jahre 1806 beschrieb Corvisart ein Krankheitsbild, das mit einer Entzündung des Herzens und einer progredienten Verschlechterung der Herzfunktion einherging. Als Ursache hierfür vermutete er ein infektiöses Agens¹. Sobernheim charakterisierte dieses Krankheitsbild 1832 schließlich mit dem Begriff Myokarditis². Die Weiterentwicklung von Untersuchungsmethoden und der Zuwachs an histopathologischem Wissen im Verlauf des 19. Jahrhunderts ermöglichte schließlich eine Abgrenzung dieses Krankheitsbildes von anderen Herzerkrankungen³. 1986, fast 200 Jahre nach der Erstbeschreibung, erfolgte durch die Festlegung der Dallas-Kriterien die erste histopathologische Klassifizierung der Myokarditis⁴. Hierauf aufbauend wurde 9 Jahre später die Myokarditis durch die Weltgesundheitsorganisation (WHO: *World Health Organisation*) und die Internationale Gesellschaft und Föderation für Kardiologie (ISFC: *International Society and Federation of Cardiology*) als eine „entzündliche Erkrankung des Myokards, die durch etablierte histologische, immunologische und immunhistologische Kriterien diagnostiziert wird“, definiert⁵. Ende der 90iger Jahre des letzten Jahrhunderts wurde die histopathologische Einteilung der Myokarditis auf der Grundlage der Dallas-Kriterien um immunohistochemische Kriterien ergänzt. Eine Myokarditis liegt seitdem bei Nachweis von mehr als 14 infiltrierenden Leukozyten/mm², bestehend aus Lymphozyten oder Makrophagen, einer Gewebsschädigung mit Nekrose und ödematösen Veränderungen vor⁶. Im Jahre 2006 wurde die Definition schließlich von der *American Heart Association* (AHA) aktualisiert und erweitert. Als Myokarditis wird ein „akut oder chronisch entzündlicher Prozess, der das Myokard betrifft und durch eine Vielzahl von Toxinen und Medikamenten (...), oder infektiösen Agentien (...) ausgelöst werden kann“, definiert⁶.

Die Inzidenz und Prävalenz der Myokarditis lassen sich aufgrund des variablen und teils asymptomatischen klinischen Verlaufs nur schwer abschätzen⁷. Die Inzidenz wird auf 22 Myokarditiden pro 100.000 Menschen geschätzt⁸. Die Myokarditis ist jedoch vor allem eine Erkrankung des jungen Menschen. Ca. 52% aller Myokarditiden treten im Alter unter 40 Jahren auf, wohingegen nur 5% der Myokarditis-Patienten älter als 60 Jahre sind⁹. Sie ist die dritt häufigste Todesursache bei Leistungssportlern¹⁰. Insgesamt erkranken mehr Männer als Frauen¹¹⁻¹³. Es wird angenommen, dass die Myokarditis eine mögliche Ursache für den plötzlichen Kindstod ist^{14,15}. Verschiedene Studien, die sich mit den

Ursachen einer neu aufgetretenen Herzinsuffizienz beschäftigten, konnten in bis zu 67% der Fälle myokarditische Veränderungen nachweisen¹⁶⁻¹⁸. In einer Autopsie-Studie der 50er Jahre des letzten Jahrhunderts stellten Blankenhorn *et al.* bei bis zu 9% des Sektionsgutes die Diagnose einer Myokarditis¹⁹. Untersuchungen von Patienten, die an einem plötzlichen Herztod starben, zeigten ebenfalls in 8,6% der Fälle das Bestehen einer entzündlichen Herzerkrankung, wie einer Myokarditis²⁰. Dies verdeutlicht die medizinische Bedeutung der Myokarditis.

Im Gegensatz zur Myokarditis wurde der Begriff Kardiomyopathie erst 1957 durch Sir Russell Brock geprägt²¹. Die WHO definierte ihn erstmals 1980. Nach einer Überarbeitung im Jahre 1995 durch WHO und ISFC versteht man hierunter eine „Erkrankung des Myokards, die mit einer kardialen Dysfunktion assoziiert ist“⁵. Die dilatative Kardiomyopathie (DCM: *dilated cardiomyopathy*) ist eine Entität der Kardiomyopathie. Sie ist durch eine links- oder biventrikuläre Dilatation mit systolischer Dysfunktion charakterisiert und kann nicht auf anormale Ventrikelfüllungsmodalitäten (z.B. Hypertension, Herzklappenerkrankungen) oder ausschließlich auf eine koronarerterielle Erkrankung zurückgeführt werden^{22,23}. Die DCM stellt das gemeinsame Endstadium unterschiedlicher Herzerkrankungen dar. Über einen Teil ihrer Ätiologie war lange Zeit wenig bekannt, weshalb sie auch als idiopathische DCM bezeichnet wurde. Mit der Entwicklung neuer molekularbiologischer Verfahren gegen Ende des letzten Jahrhunderts gelang es Bowles *et al.* erstmals zu zeigen, dass bei einem Teil der Patienten ein virales Genom nachweisbar ist. Somit scheinen Myokarditis und DCM miteinander verknüpft zu sein²⁴. Diese Vermutung bestätigte sich in den folgenden Jahren zunehmend. Verschiedene Studien konnten bei bis zu 50% der DCM-Patienten eine chronische Myokarditis nachweisen^{25,26}. Daher wurde 1995 auf der Konsenskonferenz von WHO und ISFC die Kombination aus Myokarditis und kardialer Dysfunktion als entzündliche Kardiomyopathie definiert⁵.

1.2 Ätiologie

Die Myokarditis kann sowohl durch infektiöse als auch nicht-infektiöse Pathogene ausgelöst werden. Neben Medikamenten und Toxinen können systemische oder auf das Myokard begrenzte immunologische Prozesse Auslöser sein. Als infektiöse Agenzien kommen Bakterien, Pilze, Parasiten und Viren infrage^{27,28}. Die verschiedenen möglichen infektiösen und nicht-infektiösen Agenzien sind in der Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1 – Mögliche Auslöser einer Myokarditis.

SLE: Systemischer Lupus erythematoses, CMV: Cytomegalie-Virus, EBV: Epstein-Barr-Virus, HAV: Hepatitis-A-Virus, HCV: Hepatitis-C-Virus, HHV-6: Humanes Herpes-Virus-6, HIV: Humanes Immundefizienz-Virus, HSV-1: Herpes-simplex-Virus-1, RS-Virus: respiratorisches Synzytial-Virus, VZV: Varizeller-Zoster-Virus. Angelehnt an Ellis *et al.*²⁷, ergänzt um Johnson *et al.*²⁹ und Mahmood *et al.*³⁰

Nicht-Infektiös		Infektiös			
Medikamente und Toxine	Immunologisch	Bakterien	Viren	Pilze	Parasiten
Amitriptylin, Anthracycline, Arsen, Kohlenstoffmonoxid, Cefaclor, Colchicin, Clozapin, Ethanol, Furosemid, Immun-Check-Point-Inhibitoren, Isoniazid, Kupfer, Lidocain, Penicillin, Phenytoin, Schlangen- oder Skorpiongifte, Thiazide, Tetrazykline, Tetanus Toxoid, Trastuzumab	Alloantigene (Herztransplantationsempfänger), Chagas-Krankheit, Morbus Kawasaki, Riesenzell-myokarditis, Sarkoidose, Sklerodermie, SLE, Wegener'sche Granulomatose, Polymyositis	<i>Corynebacterium diptheriae</i> , <i>Coxiella burnetii</i> u. <i>chaffeensis</i> , <i>Haemophilus influenzae</i> , <i>Mycoplasma pneumoniae</i> , <i>Neisseria meningitides</i> , <i>Nocardia</i> sp., <i>Leptospira</i> , <i>Rickettsia</i> sp., <i>Streptobacillus monilliformis</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Treponema pallidum</i> , <i>Vibrio cholerae</i>	Adenovirus, Enteroviren, CMV, Dengue-Virus, Echoviren, Encephalomyokarditis-Virus, EBV, HAV, HCV, HHV-6, HIV, Influenza A und B Viren, HSV-1, Parvovirus B19, RS-Virus, Vakzine (VZV, Gelbfieber-Virus)	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Blastomyces</i> sp., <i>Candida</i> sp., <i>Coccidioides</i> , <i>Cryptococcus</i> sp., <i>Histoplasma</i> sp.,	<i>Ascaris</i> sp., <i>Echinococcus granulosus</i> , <i>Schistosoma</i> sp., <i>Taenia solium</i> , <i>Toxoplasma gondii</i> , <i>Trichinella spiralis</i> , <i>Trypanosoma cruzi</i> , <i>Wucheria bancrofti</i>

1.3 Virale Myokarditis

Virusinfektionen sind in Europa und Nordamerika die häufigsten Auslöser einer Myokarditis. Von Bedeutung sind hierbei Infektionen durch Adenoviren, das Parvovirus B19, das Hepatitis-C-Virus (HCV), das Cytomegalie-Virus (CMV), das humane Immundefizienz-Virus (HIV), Inflenzaviren und Enteroviren^{28,31-35}. Insbesondere die Coxsackieviren, als Vertreter der Enteroviren, zählen zu den häufigsten Erregern einer Virusmyokarditis in unseren Breiten^{24,31,36}.

1.3.1 Krankheitsverlauf der viralen Myokarditis

Die virale Myokarditis präsentiert sich mit einer breiten Varianz an möglichen Symptomen. Sie kann einerseits als eine Art „Herzschnupfen“ mit unspezifischen Zeichen eines viralen Infektes, wie Fieber, Abgeschlagenheit und Leistungsschwäche, imponieren. In diesem Fall bleibt die Virusmyokarditis dann meist unerkannt und heilt innerhalb von Wochen oder Monaten folgenlos aus³⁷. Andererseits können virale Myokarditiden auch mit akut einsetzenden herzspezifischen Beschwerden, wie Tachykardien, Palpitationen, Arrhythmien, pektanginösen Beschwerden, Synkopen,

Belastungsdyspnoe, einer akuten kardialen Dekompensation mit konsekutiv möglichem Multiorganversagen und hoher Mortalität einhergehen. Vor allem Neugeborene und Heranwachsende leiden häufiger unter akuten und schweren Verläufen, während Erwachsene eher einen milderen Krankheitsverlauf erleiden³⁸. Patienten, denen es im Verlauf der Erkrankung gelingt, das Virus spontan zu eliminieren, zeigen häufig eine vollständige Erholung der kardialen Funktion mit Ausheilung der Myokarditis. Patienten, bei denen das Virus im Myokard jedoch persistiert, leiden häufig unter einer progredienten Verschlechterung der kardialen Funktion und entwickeln eine inflammatorische Kardiomyopathie³⁹. Aber auch das Ausmaß der Initialsymptome hat Einfluss auf die Prognose. Ein fulminanter Verlauf während der initialen Krankheitsphase ist mit einer hohen Letalität und Notwendigkeit zur mechanischen Herz-Kreislauf-Unterstützung oder Herztransplantation assoziiert⁴⁰⁻⁴². Etwa ein Drittel aller Patienten mit einer Virusmyokarditis entwickeln eine chronische Erkrankung mit Viruspersistenz und progredienter Herzinsuffizienz⁴³. Neben der Viruspersistenz, der chronischen Entzündungsreaktion und der Entwicklung einer kardialen Dysfunktion stellt die Entwicklung kardiodepressiver Autoantikörper einen für den Krankheitsverlauf prognostisch ungünstigen Prädiktor dar^{12,44}. Für die Sicherung der Diagnose und Einleitung einer spezifischen Therapie ist es wichtig, Myokardbiopsien zu gewinnen und diese histopathologisch und immunhistologisch zu untersuchen⁴⁵. Alternativ zu diesem diagnostischen Goldstandard kann die Diagnose auch durch kardiale Magnetresonanztomographie gesichert werden^{22,46,47}. Mit Hilfe der Untersuchungsergebnisse und Klinik lässt sich die Myokarditis in 4 Verlaufsformen mit unterschiedlicher Prognose einteilen. Diese sind in Tabelle 2 dargestellt⁴⁸.

1.3.2 Coxsackievirus-induzierte Myokarditis

Coxsackieviren sind unbehüllte, humanpathogene Viren der Gattung *Enterovirus* und gehören zur Familie der *Picornaviridae*. Es werden zwei Subgruppen unterschieden: Gruppe A mit 24 Serotypen und Gruppe B mit 6 Serotypen. Das ikosaedrische Kapsid des Virus enthält einen Ribonukleinsäure-Einzelstrang mit positiver Polarität (ss(+)-RNA). Der natürliche Wirt dieses Enterovirus ist der Mensch. Es sind aber auch Infektionen von Tieren, insbesondere von Mäusen, möglich⁴⁹. Da das Virus säurestabil ist, kann es die Magenpassage überstehen. Neben einer Tröpfcheninfektion ist somit auch eine fäkal-orale Übertragung möglich⁴⁹. Infektionen mit Coxsackieviren verlaufen häufig unspezifisch und können verschiedene Krankheitsbilder wie die Hand-Fuß-Krankheit,

Tabelle 2 - Klinisch-pathologische Einteilung der Myokarditiden.

Aufgrund der klinischen Präsentation und basaler histologischer Untersuchungen kann die Myokarditis in 4 Typen eingeteilt werden. DCM: Dilatative Kardiomyopathie. Modifiziert in Anlehnung an Lieberman *et al.* 48

Verlaufsform	Fulminant	Akut	Chronisch aktiv	Chronisch persistent
Beginn kardialer Symptome	Typisch	Untypisch	Untypisch	Untypisch
Klinik bei Erstvorstellung	Kardiogener Schock, schwere linksventrikuläre Dysfunktion	Herzinsuffizienz mit linksventrikulärer Dysfunktion	Herzinsuffizienz mit linksventrikulärer Dysfunktion	Nichtkardiale Symptome, normale linksventrikuläre Funktion
Histopathologischer Befund der ersten Biopsie	Multiple Foci einer aktiven Myokarditis	Aktive oder Borderline-Myokarditis	Aktive oder Borderline-Myokarditis	Aktive oder Borderline-Myokarditis
Klinischer Verlauf	Komplette Remission oder Tod	Inkomplette Remission oder DCM	Nicht-kardiale Symptome, normale linksventrikuläre Funktion	
Histopathologischer Verlauf	Vollständige Auflösung der aktiven Myokarditis	Teilweise Auflösung der aktiven Myokarditis	Weiterführende oder sich auflösende Myokarditis, Fibrose und Riesenzellen	Weiterführende oder sich auflösende Myokarditis

∞

Atemwegsinfektionen, Konjunktividen, Durchfallerkrankungen, aseptische Meningitiden, Meningoenzephalitiden, Perikarditiden oder Myokarditiden auslösen⁵⁰. Von großer Bedeutung für die Genese der Myokarditis sind die Coxsackieviren der Gruppe B. Diese konnten zu einem hohen Anteil in Endomyokardbiopsien erkrankter Patienten nachgewiesen werden^{24,31,36}. Der häufig fulminante Verlauf von Coxsackievirus B-assoziierten Myokarditiden bei Kindern und Neugeborenen unterstreicht die ätiologische Bedeutung⁵¹. Insbesondere das Coxsackievirus B3 (CVB3) ist für eine Vielzahl von Myokarditiden verantwortlich⁵².

CVB3 gelangt für gewöhnlich über den Nasenrachenraum und den Magen-Darm-Trakt in den Wirtsorganismus⁴⁹. Hier werden primär B-Lymphozyten in den sekundär lymphatischen Organen wie Lymphknoten und Milz infiziert. Über das Blut- und Lymphsystem gelangt das CVB3 in die sekundären Zielorgane wie Leber, Pankreas, Gehirn und Herz^{50,53}. Im Gegensatz zu anderen kardiotropen Viren wie dem Parvovirus B19 oder dem Human-Herpes-Virus-6 (HHV-6) infizieren Enteroviren die Kardiomyozyten direkt⁵⁴⁻⁵⁶. CVB3 bindet hierfür über den Coxsackievirus-Adenovirus-Rezeptor (CAR) und den Ko-Rezeptor Zerfall-beschleunigender Faktor (DAF: *decay-accelerating-factor*) an die Zellmembran der Zielzellen und wird anschließend internalisiert^{53,57}. Nach dem Freisetzen des Virusgenoms übernimmt CVB3 die Proteinbiosynthese der Wirtszelle und synthetisiert ein virales Polyprotein^{7,58,59}. Dieses wird durch eine viruseigene Proteinase in die einzelnen Virusproteine gespalten⁵⁹. Die virale RNA-Polymerase synthetisiert neue ss(+)RNA-Stränge^{43,60}. Aus den synthetisierten Virusstrukturproteinen wird das Kapsid gebildet, in welches die replizierte ss(+)RNA eingebettet wird. Die Freisetzung der infektiösen Viruspartikel erfolgt durch Zytolyse oder Apoptose der Wirtszelle^{61,62}.

In Abhängigkeit von der genetischen Prädisposition, der Immunkompetenz, dem Alter und Geschlecht des Wirtes sowie anderen noch unbekanntem Faktoren kommt es zu einem unterschiedlichen Ausmaß an myokardialer Schädigung und zu einer unterschiedlichen Dauer des myokardialen Entzündungsprozesses^{63,64}. Gelingt es dem Wirtsorganismus, das Virus frühzeitig zu eliminieren, kann die kardiale Inflammation abklingen und die Myokarditis ausheilen. Persistieren das Virus und/oder die kardiale Entzündungsreaktion, kann sich eine chronische Myokarditis mit einer unterschiedlich ausgeprägten kardialen Dysfunktion entwickeln. Für die Progredienz der kardialen Dysfunktion ist eine Persistenz der Entzündungsreaktion nicht zwingend notwendig.

Entwickelt sich trotz Sistierens der Entzündungsreaktion eine Herzmuskelschwäche wird diese als DCM bezeichnet. Besteht die Entzündungsreaktion fort und entwickelt sich eine Kardiomyopathie, wird von einer inflammatorischen Kardiomyopathie gesprochen^{22,65}.

1.4 Rolle des Immunsystems bei der CVB3-induzierten Myokarditis

Das Immunsystem dient der Abwehr pathogener Krankheitserreger wie Bakterien, Viren, Pilzen und Parasiten sowie der Eliminierung körperfremder, potentiell schädlicher Substanzen und pathologisch veränderter körpereigener Zellen. Es besteht aus einer angeborenen, auch unspezifisch genannten, und einer adaptiven, auch als erworben oder spezifisch bezeichneten, Komponente. Beide Systeme arbeiten zusammen, ergänzen sich und ermöglichen eine schnelle und effektive Immunabwehr.

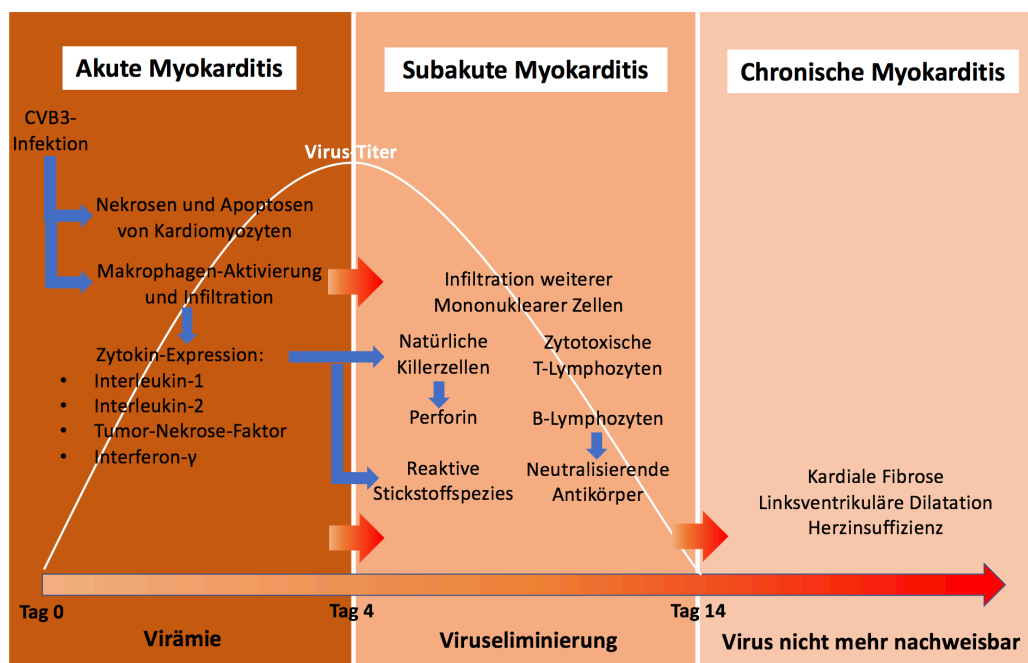


Abbildung 1 - Zeitlicher Verlauf der murinen Virusmyokarditis.

Die Zeitachse ist nicht maßstabsgetreu dargestellt. Modifiziert nach Kawai *et al.*⁶⁶ und Feldman *et al.*⁶³.

Ein großer Teil des Verständnisses über den Ablauf viraler Myokarditiden stammt aus murinen Studien. Da Virusmyokarditiden beim Menschen und der Maus ähnlich verlaufen, sind Rückschlüsse von der Maus auf den Menschen möglich^{59,67}. Mit Hilfe verschiedener Maus-Stämme, die eine unterschiedliche Empfänglichkeit für kardiotope Viren besitzen und hierdurch unterschiedliche Verläufe einer Myokarditis entwickeln, konnte viel über die zugrundeliegenden immunologischen Prozesse gelernt werden. Den unterschiedlichen Krankheitsverläufen zum Trotz sind Gemeinsamkeiten bezüglich der Immunzellinfiltration, der Zytokinexpression sowie der Häufigkeit von Nekrosen und

Apoptosen im zeitlichen Verlauf vorhanden. Die Virusmyokarditis wird entsprechend des zeitlichen Verlaufs, der in Abbildung 1 grob skizziert ist, in drei Stadien eingeteilt^{63,66}:

- 1) Akute Myokarditis (0.-3. postinfektiöser Tag)
- 2) Subakute Myokarditis (4.-14. postinfektiöser Tag)
- 3) Chronische Myokarditis (ab dem 15. postinfektiösen Tag)

Die **akute Phase** ist durch die initiale Virusinfektion und die ansteigende Virusreplikation gekennzeichnet. Die myokardiale Schädigung erfolgt während dieser Frühphase vor allem durch die Interaktion von Virus und Wirtszelle. Die Infektion der Kardiomyozyten führt zu CVB3-bedingten zytopathischen Effekten wie der Schädigung von Dystrophin oder der Sarkomere. Hieraus resultiert eine Abnahme der Kontraktionsfähigkeit der infizierten Kardiomyozyten^{68,69}. CVB3-bedingte Zytolysen und Apoptosen ziehen den Verlust von Kardiomyozyten nach sich und dezimieren hierdurch die Kontraktionsfähigkeit weiter⁶². Die CVB3-Infektion bedingt aber auch die Freisetzung von pro-inflammatorischen Zytokinen wie Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α), Interferon (INF)- γ , Interleukin (IL)-1 α , IL-5, IL-6 und IL-7. Diese werden durch ortsständige Zellen wie Kardiomyozyten, Fibroblasten und Endothelzellen exprimiert^{66,70,71}. Zytokine sind biologisch aktive Hormone mit sehr kurzer Halbwertszeit. Sie wirken para- oder autokrin. Mit Hilfe der Zytokine wird die Entzündungsreaktion koordiniert und moduliert. Während des akuten Myokarditis-Stadiums rufen die Zytokine ab dem 3. postinfektiösen Tag die Infiltration von Immunzellen des angeborenen Immunsystems wie Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) und Makrophagen hervor^{66,69,72}. Sie hemmen aber auch die Virusausbreitung durch Suppression der Boten-Ribonukleinsäure (mRNA: *messenger-RNA*)-Translation und Förderung des mRNA-Abbaus. Dies zieht eine verminderte Synthese von Virusproteinen und einen vermehrten Abbau der Virus-mRNA nach sich. Zudem induzieren die sezernierten Zytokine eine vermehrte Expression von Haupt-Histokompatibilitäts-Komplexen (MHC: *Major-Histocompatibility-Complex*) der Klasse I (MHC-I) und steigern damit die Antigenpräsentation auf der Zelloberfläche. Hierdurch können virusinfizierte Zellen vom Immunsystem besser erkannt werden⁷³.

Während der **subakuten Phase** setzt sich das Immunsystem des Wirtes intensiv mit dem Virus auseinander. In der frühen Phase, zwischen dem 4.-7. postinfektiösen Tag, dominieren die Immunzellen der angeborenen Immunabwehr. Hier sind insbesondere NK-Zellen und Makrophagen zu nennen⁷⁴. Sie dämmen den Virusinfekt ein und beginnen mit der Viruselimination, so dass die CVB3-Viruslast ihr Maximum um den 4.

postinfektiösen Tag erreicht^{66,69,72}.

Die NK-Zellen können über Antigene, die auf MHC-Klasse I-Molekülen präsentiert werden, CVB3-infizierte Zellen identifizieren. Im Gegensatz zu Immunzellen des erworbenen Abwehrsystems müssen sie hierfür nicht aktiviert werden. Vielmehr unterdrückt die Präsentation nicht-pathologischer Antigene eine Zytolyse der überprüften Zelle. Fehlt dieser hemmende Stimulus wird durch die Sekretion zytotoxischer Effektormoleküle, wie Perforin, die Apoptose induziert⁷⁵.

Makrophagen sind Teil des Mononukleären-Phagozyten-Systems und entwickeln sich unter dem Einfluss von Zytokinen aus Monozyten. Sie immigrieren im Rahmen entzündlicher Prozesse aus dem Blut, sind aber auch ortsständiger Bestandteil des gesunden Myokards⁷⁶. Makrophagen werden mit Hilfe von Pathogenen-Muster-Erkennungsrezeptoren (PRR: *pathogen-recognition-receptors*) wie dem *Scavenger*- oder dem *Toll-like*-Rezeptoren aktiviert, nachdem diese durch Pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMPs: *pathogen-associated molecular patterns*) stimuliert wurden. CVB3 selbst, aber auch durch Apoptose oder Nekrose entstandene Zellreste fungieren hierbei als PAMP's⁷⁷. Entsprechend dem Phänotyp werden grob 2 Makrophagen-Subpopulationen unterschieden. Unter dem Einfluss von Zytokinen polarisieren sich Makrophagen entweder zu den klassisch-aktivierten M1-Makrophagen oder den alternativ-aktivierten M2-Makrophagen⁷⁸. Während die klassisch-aktivierten Makrophagen entzündungsfördernd und für die Abwehr von Pathogenen, wie dem CVB3, verantwortlich sind, sind alternativ-aktivierte Makrophagen eher entzündungshemmend und bei der Wundheilung von Bedeutung⁷⁹. Die Differenzierung in M1- oder M2-polarisierte Makrophagen ist jedoch nicht starr. Im Sinne einer Plastizität können auch M1-Makrophagen Eigenschaften von M2-Makrophagen ausbilden⁸⁰. Die M1-Polarisierung wird durch Zytokine wie INF- γ , das von NK-Zellen und Typ 1-T-Helfer-Lymphozyten (T_H1-Zellen) im Rahmen der Infektion gebildet wird, sowie IL-12 und IL-16 induziert⁸¹. Die klassisch-aktivierten M1-Makrophagen phagozytieren, lysieren und prozessieren die erkannten Pathogene. Anschließend präsentieren sie diese über MHC-Klasse II-Moleküle auf der Zelloberfläche⁷⁷. Sie ermöglichen damit als Teil der Antigen-präsentierenden Zellen (APC: *antigen-presenting cells*) die Aktivierung des spezifischen Immunsystems. Durch Rückkopplungen mit T-Helfer-Zellen wird die Entzündungsreaktion verstärkt und auf das auslösende Agens spezifiziert. Aufgrund der Beteiligung von T_H1-Zellen wird diese Abwehrreaktion auch als T_H1-Reaktion bezeichnet⁷⁸. Neben der Phagozytose führt die Stimulation der Makrophagen über die

PRR zur vermehrten Sekretion weiterer pro-inflammatorischen Zytokine, Chemokine und einer vermehrten Expression von Zelladhäsionsmolekülen wie dem Interzellulären Adhäsionsmolekül-1 (ICAM-1: *intercellular-adhesion-molecule-1*) auf Endothelzellen. Hierdurch wird die Immigration weiterer Immunzellen gefördert und die Entzündungsreaktion verstärkt⁸². Als eine Reaktion auf den intrazelluläre Erreger CVB3 kommt es zur Produktion reaktiver Stickstoff- und Sauerstoffverbindungen, die die Virusreplikation hemmen und eine Apoptose der Wirtszelle auslösen⁸³. Nach dem Überwinden der Infektion wird durch die Sekretion von IL-4 und IL-13 die M2-Polarisierung induziert. Die alternativ-aktivierten M2-Makrophagen limitieren die Entzündungsreaktion durch die Freisetzung von anti-inflammatorischen Zytokinen wie IL-10. Durch die Sekretion von Wachstumsfaktoren, Matrix-Metalloproteasen (MMPs) und Gewebsinhibitoren der MMPs (TIMPs: *tissue inhibitors of matrixmetalloproteases*) initiieren sie zusätzlich die Wundheilung, das Remodeling und die Fibrosierung⁷⁹.

Das adaptive Immunsystem mit seinen T- und B-Lymphozyten benötigt für die Ausbildung einer suffizienten Abwehrreaktion einen gewissen zeitlichen Vorlauf. Dies liegt in der Art der Aktivierung und der, durch *Rearrangement* variabler Bereiche, erst zunehmenden Antigen-Affinität und damit -Spezifität der Rezeptoren oder Immunglobuline begründet. Daher kommt die Abwehrfunktion des adaptiven Immunsystems erst in der Spätphase des subakuten Myokarditis-Stadiums zum Tragen^{66,84,85}.

Die auch T-Zellen genannten T-Lymphozyten sind *cluster of differentiation* (CD)3-positiv und besitzen einen T-Zell-Rezeptor mit dem sie in der Lage sind CVB3-infizierte Zellen zu erkennen. Dies erfolgt über Protein- oder Peptidfragmente, die von Körperzellen über MHC-Klasse I- und MHC-Klasse II-Moleküle präsentiert werden⁸⁶. Die T-Zell-Population lässt sich entsprechend ihrer Effektorfunktion in die CD4-positiven T-Helferzellen, die CD8-positiven zytotoxischen T-Zellen, die regulatorischen T-Zellen und die T-Gedächtniszellen unterteilen. Die T-Gedächtniszellen rekrutieren sich sowohl aus den T-Helfer- als auch den zytotoxischen T-Zellen. Sie ermöglichen dem Abwehrsystem im Falle einer Reinfektion sofort mit einer spezifischen Immunantwort zu reagieren. Die zytotoxischen T-Zellen erkennen infizierte Zellen über Antigene, die auf den MHC-Klasse I-Moleküle jeder Körperzelle präsentiert werden. Anschließend lysieren sie diese Zellen⁸⁶. Die T-Helfer-Zellen sind für die Stimulation anderer Immunzellen zuständig. Sie modulieren die Entzündungsreaktion und sind für die Initiation der spezifischen humoralen Immunantwort verantwortlich. Die naiven T-Helfer-Zellen befinden sich im Blut und in lymphatischen Organen. Sie werden über Antigene, die auf

MHC-Klasse II-Molekülen von APC's präsentiert werden, aktiviert und differenzieren sich zu T_H1-Zellen, Typ2-T-Helferzellen (T_H2-Zellen), Typ17-T-Helferzellen (T_H17-Zellen) oder regulatorischen T-Zellen mit jeweils spezifischen Zytokinexpressionsmustern und Effektorfunktionen. Die T_H1-Zellen sind durch eine vermehrte Expression von INF- γ gekennzeichnet. Sie lenken unter Einbeziehung von Makrophagen die Entzündungsreaktion in Richtung einer vermehrten zellulären Immunabwehr⁷⁸. Die T_H2-Zellen bahnen durch die Aktivierung von B-Lymphozyten die spezifische humorale Abwehr. Sie sind durch die vermehrte Sekretion von IL-4, IL-5 und IL-13 charakterisiert und induzieren im Rahmen der humoralen Abwehr den Isotopen-Wechsel der Antikörper. Sie können durch Sekretion von IL-10 einen anti-inflammatorischen Einfluss auf die T_H1-Antwort nehmen⁸⁷. Die T_H17-Antwort ist durch eine starke IL-17-Sekretion geprägt. Sie führt zu einer vermehrten Gewebsinflammation und kann durch gesteigertes myokardiales Remodeling die Entwicklung einer DCM zur Folge haben^{87,88}. Die regulatorischen T-Lymphozyten kontrollieren die Entzündungsreaktion. Sie erhalten die periphere Toleranz und unterdrücken die Entwicklung einer Autoimmunität⁸⁹.

Die B-Lymphozyten, auch B-Zellen genannt, sind die Effektorzellen der erworbenen humoralen Immunantwort. Nach ihrer Aktivierung, z.B. über die T-Helfer-Zellen, differenzieren sie sich zu Plasmazellen, die spezifische Antikörper gegen pathogene Strukturen bilden. Im Rahmen der CVB3-Infektion infiltrieren diese Zellen zwischen dem 8. und 10. postinfektiösen Tag in das Myokard. Sie produzieren CVB3-neutralisierende Antikörper, die zur kompletten Viruselimination führen können^{66,90}.

Die **chronische Phase** der Myokarditis ist durch eine Persistenz der Entzündungsreaktion gekennzeichnet. Immunkompetente Individuen sind imstande, das Virus innerhalb von 2 Wochen zu eliminieren⁹⁰. Neben einer *Restitutio ad integrum* ist es aber möglich, dass die Entzündungsreaktion weiter persistiert und eine progrediente Herzinsuffizienz resultiert. Als Mechanismus hierfür werden der chronische Entzündungsstimulus durch die Persistenz von CVB3^{66,91} und die Entwicklung einer Autoimmunität angenommen⁵⁸. Neben einer chronischen Viruspersistenz mit erhaltener Virusreplikation innerhalb des Myokards⁹¹ werden rekurrende myokardiale Reinfektionen durch in anderen Körperkompartimenten persistierende und replizierende Viren oder eine chronische Persistenz von CVB3-RNA in myokardialen Zellen als Ursache für eine direkte CVB3-induzierte chronische Inflammation postuliert^{66,91}. Die Autoimmunität beruht auf der Bildung von Autoantikörpern und autoreaktiven T-Zellen.

Sie kann zum einen durch molekulares Mimikry entstehen. Hierunter versteht man das Kreuzreagieren von ursprünglich gegen Virus-Antigene gerichteten Antikörpern und T-Zellen mit körpereigenen Strukturen⁹²⁻⁹⁵. Sie kann zum anderen durch die Präsentation von Myokard-spezifischen Epitopen, die dem Immunsystem normalerweise nicht zugänglich sind und im Rahmen der Infektabwehr und CVB3-bedingten Zytolyse freigesetzt und präsentiert werden, entstehen^{94,96}.

Eine wichtige Schlüsselrolle für die Entwicklung der CVB3-bedingten Autoimmunität wird der differenzierten Zytokin-Expression und dem angeborenen Immunsystem zugeschrieben⁹⁷. Eine erhöhte Expression von TNF- α und IL-1 β steigert und eine vermehrte Expression von INF- γ und dem transformierenden Wachstumsfaktor- β (TGF- β : *transforming growth factor- β*) reduziert die Entstehung von Autoimmunität⁹⁷. Ebenso induziert eine hohe Infiltration von Makrophagen, insbesondere von M1-Makrophagen, ein autoimmunologisches Geschehen⁹⁷.

1.5 Myokardiales Remodeling und dessen Einfluss auf die myokarditische Pathogenese

Als myokardiales Remodeling bezeichnet man Veränderungen von Größe, Form und Funktion des Herzens, die durch Schädigungen unterschiedlichster Art hervorgerufen werden können. Mögliche Auslöser sind unter anderem entzündliche Herzerkrankungen, wie die Myokarditis. Das myokardiale Remodeling geht mit Veränderungen der Zellen und des Interstitiums sowie der Genexpression und der molekularen Zusammensetzung einher⁹⁸. Es ist ein physiologischer Prozess, mit dem der Organismus nach einer Schädigung oder Mehrbeanspruchung versucht, die kardiale Funktion kompensatorisch aufrechtzuhalten. Eingeleitet werden diese Anpassungsvorgänge unter anderem durch Entzündungsreaktionen oder die Aktivierung neurohumoraler Systeme⁹⁹. In Abhängigkeit vom Ausmaß der Schädigung oder Belastung kann es jedoch sein, dass der Funktionsverlust nicht oder nicht dauerhaft kompensiert werden kann. Fortwährende Anpassungsversuche führen dann zu einem *Circulus vitiosus*, bestehend aus einer weiteren neurohumoralen Aktivierung, konsekutivem Remodeling und weiterem Abnehmen der kardialen Funktion⁹⁹. Dies wird auch als maladaptives Remodeling bezeichnet¹⁰⁰. Im Falle der Myokarditis kann auch nach Terminierung der Entzündungsreaktion das maladaptive Remodeling persistieren und die kardiale Dysfunktion voranschreiten.

1.5.1 Extrazelluläre Matrix (EZM)

Die EZM ist ein wichtiges Strukturelement des Myokards und für dessen Funktion von großer Bedeutung. Sie umfasst den extrazellulären Raum zwischen den Zellen und besteht aus einer Vielzahl von Makromolekülen, die grob in Proteoglykane und Faserproteine unterteilt werden können¹⁰¹. Die, zu den Faserproteinen gehörenden, Kollagene sind von besonderer Bedeutung und werden von kardialen Fibroblasten synthetisiert¹⁰². Im Myokard sind fünf Kollagen-Subtypen zu finden: Kollagen I, Kollagen III, Kollagen IV, Kollagen V und Kollagen VI. Den größten Anteil nehmen hierbei Kollagen I und Kollagen III, mit 80% bzw. 10%, ein¹⁰³. Das aus den Kollagenfibrillen gebildete Netzwerk ist für die Geometrie und die Gewebeeigenschaften des Herzens verantwortlich¹⁰². Während Kollagen I eher steif ist und die Widerstandsfähigkeit gegen Verformung und Dehnung vermittelt, ist Kollagen III eher elastisch und für die Retraktionsfähigkeit des Myokards verantwortlich¹⁰². Bereits unter physiologischen Normalbedingungen unterliegt die EZM permanenten Veränderungen¹⁰⁴. Neben der Neusynthese der EZM-Komponenten ist der koordinierte Abbau wichtig. Dieser erfolgt durch verschiedene Proteasen¹⁰¹. Eine myokardiale Schädigung, die ein Remodeling auslöst, kann zu einer Dysbalance zwischen Auf- und Abbau führen und den qualitativen wie quantitativen Kollagengehalt verändern¹⁰⁵. Eine Zunahme des Gesamtkollagens, auch Fibrose genannt, führt ebenso wie eine relative Zunahme des Kollagen I-Gehaltes zu einer vermehrten Steifigkeit und Abnahme an Retraktionsfähigkeit. Hieraus können eine systolische und diastolische Dysfunktion resultieren^{106,107}.

1.5.2 Matrix-Metalloproteasen (MMPs) und Tissue Inhibitor of Metalloproteases (TIMPs)

MMPs und TIMPs, als die regulatorische Gegenspieler der MMPs, sind wichtige Protagonisten des kardialen Remodelings¹⁰⁸.

MMPs sind Endopeptidasen, die die Spaltung von Peptidbindungen katalysieren. Aktuell umfasst ihre Familie 26 Kalzium-abhängige, Zink-haltige Proteinasen¹⁰⁸, die in lösliche MMPs und Membran-gebundene MMPs (MT-MMPs: *Membrane-type-MMP*) unterteilt werden können. Aufgrund einer relativen Substratspezifität ist eine weitere Klassifizierung in Kollagenasen, Gelatinasen, Stromelysine und Matrilysine möglich¹⁰⁸. MMPs werden von unterschiedlichen Bindegewebs- und Entzündungszellen exprimiert. Neben der Degradierung von EZM-Strukturproteinen wie Kollagen sind MMPs an zahlreichen anderen Vorgängen wie dem Abbau von Zytokinen z.B. TGF- β und

IL-1 β ^{109,110}, dem Ablauf der Apoptose¹¹¹ oder der Aktivierung anderer MMPs¹¹² beteiligt. Im Rahmen des myokardialen Remodelings bedingen MMPs durch die Spaltung von Kollagen-Querverbindungen und den Abbau von EZM-Proteinen eine myokardiale Gefügestörung, die zur kardialen Dilatation und Dysfunktion führt¹¹³⁻¹¹⁵.

Die proteolytische Wirkung der MMPs wird kompetitiv durch die TIMPs inhibiert. Alle Mitglieder der TIMP-Familie, von denen derzeit 4 Vertreter bekannt sind, können nahezu alle MMPs hemmen. Die einzelnen TIMPs unterscheiden sich jedoch in ihrer Affinität zu den verschiedenen MMPs¹¹⁶⁻¹¹⁸. Im gesunden Organismus liegt ein fragiles Gleichgewicht zwischen den MMPs und TIMPs vor, welches die EZM-Zusammensetzung des Myokards wahrt¹¹⁹. Durch myokarditische Entzündungsreaktionen kann diese Balance gestört werden. Eine vermehrte Aktivität der MMPs führt dann zu maladaptivem myokardialen Remodeling^{103,120,121}.

Die Regulation des MMP/TIMP-Systems erfolgt auf unterschiedlichen Ebenen. Die Transkription wird durch Zytokine¹²²⁻¹²⁴, matrizelluläre Proteine¹²⁵, Wachstumsfaktoren¹²⁶, bioaktive Moleküle¹²⁷⁻¹³⁰, Katecholamine¹³¹, reaktive Sauerstoffspezies¹³² oder mechanische Stimuli¹³³ beeinflusst. Zusätzlich wird posttranslational die Aktivität des MMP/TIMP-Systems über die Aktivierung der MMPs reguliert. Das heißt, die als inaktive Proform synthetisierten MMPs werden durch Abspaltung des Pro-Peptids aktiviert¹⁰⁸. Einige MMPs können sich durch Autolyse selbst aktivieren¹³⁴, das Gros wird jedoch exogen durch andere MMPs oder Proteasen aktiviert^{112,135}.

1.5.3 Kardiales Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS)

Verschiedene neurohumorale Systeme beeinflussen das myokardiale Remodeling. Zu nennen sind hier das Endothelin-System^{136,137}, das sympathische Nervensystem^{131,138,139}, das natriuretische Peptid-System¹⁴⁰ und das RAAS^{141,142}. Untersuchungen der letzten Jahrzehnte zeigten insbesondere für das RAAS eine herausragende Bedeutung.

Seit langem ist das RAAS als Regelkreislauf zur Steuerung des Salz- und Wasserhaushaltes sowie des Blutdrucks bekannt. Die Aktivierung des Systems führt zur Vasokonstriktion und durch Natriumretention zur Zunahme des zirkulierenden Blutvolumens. Diese Effektorfunktionen werden durch in Epithelien exprimierte und im Blut zirkulierende RAAS-Komponenten vermittelt. Seit längerem ist jedoch bekannt, dass auch im nicht-epithelialen Parenchym verschiedener Organe RAAS-Komponenten

exprimiert werden und diese spezifische Funktionen übernehmen⁹⁹. Speziell während des myokardialen Remodeling wurde eine vermehrte kardiale Expression von RAAS-Komponenten beobachtet¹⁴³⁻¹⁴⁵. Eine Beteiligung an myokardialen Remodeling-Prozessen mit konsekutiver Entwicklung von Fibrose und linksventrikulärer Dilatation konnte für das Angiotensin-konvertierende Enzym (ACE: *angiotensin-converting-enzym*) und Angiotensin II nachgewiesen werden¹⁴⁶⁻¹⁴⁹.

Auch Aldosteron beeinflusst das myokardiale Remodeling. Bereits Anfang der 90er Jahre des letzten Jahrhunderts wurde nachgewiesen, dass ein Hyperaldosteronismus bei Ratten zu einer vermehrten Fibrose führt^{150,151}. In Aldosteron-überexprimierenden transgenen Mäusen waren zusätzlich eine linksventrikuläre Dilatation und Dysfunktion im Sinne einer DCM zu beobachten^{152,153}. Als weitere, Aldosteron-vermittelte Effekte konnten eine Zunahme des oxidativen Stresses und der Entzündungsreaktion mit vermehrter Zytokinexpression sowie Immuneinfiltration in verschiedenen Ratten-Modellen detektiert werden¹⁵⁴⁻¹⁵⁸.

Wie Aldosteron diese Effekte erzielt, ist noch unzureichend geklärt. Klassischerweise bindet Aldosteron an einen intrazellulären Mineralokortikoid-Rezeptor (MR). Dieser wird nach der Bindung in den Zellkern transloziert und induziert die Expression verschiedener Gene^{159,160}. Die hierdurch bedingten Veränderungen sind erst nach einer gewissen Latenz feststellbar und werden als genomische Effekte bezeichnet. Neben den klassischen intrazellulären MRs gibt es verschiedene, noch unvollständig charakterisierte Membran-gebundene MRs. Über diese werden schnelle, nicht-genomische Aldosteron-Effekte, wie die Steigerung der intrazellulären Natriumkonzentration oder die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies, induziert^{158,161,162}.

Der Ursprung des kardial wirksamen Aldosterons war lange Zeit unklar. Jüngste Erkenntnisse deuten auf eine, durch die Myokarditis induzierte, myokardiale Aldosteron-Synthese hin¹⁶³.

Aufgrund der Erkenntnisse über den Einfluss von Aldosteron für das kardiale Remodeling wurde bereits in den 90er Jahren des letzten Jahrhunderts versucht, das Remodeling mit Hilfe von MR-Antagonisten günstig zu beeinflussen. Bereits 1993 wiesen Brilla *et al.* für den MR-Antagonisten Spironolacton, welcher seit den 60er Jahren verfügbar ist, eine Reduktion der myokardialen Fibrose in verschiedenen Ratten-Modellen nach¹⁶⁴. Seither untersuchten verschiedene klinische Studien am Menschen den Einfluss des MR-Antagonismus auf die Entwicklung einer Herzinsuffizienz. Die 1999 publizierte

RALES-Studie¹⁶⁵ untersuchte den Einfluss einer Spironolacton-Therapie als Ergänzung zur damals empfohlenen Standard-Herzinsuffizienz-Therapie. Sie zeigte bei Patienten mit fortgeschrittener chronischer Herzinsuffizienz eine Reduktion von Mortalität und Hospitalisierungsrate. Subgruppenanalysen dieser Studie zeigten, dass die Spironolacton-Therapie zur Verminderung des Kollagen-Umsatzes und damit des Remodelings führte¹⁶⁶. Aufgrund einer geringen Spezifität bindet Spironolacton nicht nur an den MR, sondern auch an Glukokortikoid-, Progesteron- und Androgen-Rezeptoren. Hierdurch bedingt es neben einer Hyperkaliämie-Neigung, die durch die MR-Blockade vermittelt wird, zusätzlich verschiedene Sexualhormon-assoziierte Nebenwirkungen wie Gynäkomastie, Impotenz, Mastodynie bei Männern und Menstruationsunregelmäßigkeiten bei Frauen¹⁶⁵.

Zur Jahrtausendwende war schließlich das selektiver wirksame Eplerenon verfügbar. Dieses löst aufgrund einer geringeren Affinität zu Glukokortikoid- und Sexualhormon-Rezeptoren weniger Nebenwirkungen aus, inhibiert den MR aber schwächer als Spironolacton¹⁶⁷. Trotzdem konnte auch für Eplerenon durch verschiedene klinische Studien wie die EPHEBUS-Studie¹⁶⁸, die EMPHASIS-HF-Studie¹⁶⁹ oder die REMINDER-Studie¹⁷⁰ eine Reduktion von Mortalität und Re-Hospitalisierungsrate bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt oder chronischer Herzinsuffizienz gezeigt werden.

1.6 Fragestellungen dieser Arbeit

Myokarditiden werden für eine Vielzahl plötzlicher Herztode^{14,15,20}, unklarer DCM-Erkrankungen und Herztransplantationen verantwortlich gemacht^{171,172}. Viren, insbesondere das Coxsackievirus B3, stellen in unseren Breitengraden die häufigste Myokarditis-Ursache dar^{28,31-35,52}. Deshalb sind Untersuchungen zur Pathophysiologie und Therapie von wichtiger medizinischer Relevanz. Aufgrund des ähnlichen Verlaufs von humanen und murinen Myokarditiden wurden verschiedene CVB3-induzierte murine Myokarditis-Modelle etabliert^{59,67}. Die verschiedenen Mausstämme entwickeln entsprechend ihrer Immunkompetenz unterschiedliche Krankheitsverläufe. CVB3-induzierte SWR/J-Mäusen zeigen einen chronischen Krankheitsverlauf mit Viruspersistenz⁹¹. Da dieser dem Verlauf einer chronischen Myokarditis mit konsekutiver DCM-Entwicklung beim Menschen sehr ähnelt, wurde dieses Modell für die Untersuchungen der aktuellen Arbeit ausgewählt.

Verschiedene Untersuchungen konnten zeigen, dass ein MR-Antagonismus den Verlauf einer Herzinsuffizienz günstig beeinflussen kann^{164,165,167,169,170}. Unklar war jedoch, welchen Stellenwert die selektive MR-Blockade für den Krankheitsverlauf der Virusmyokarditis hat. Das Ziel dieser Arbeit ist es zu untersuchen, wie der selektive MR-Antagonismus mit Eplerenon eine CVB3-induzierte Myokarditis in einem SWR/J-Maus-Modell beeinflusst. Hierbei wird sich auf folgende Fragen fokussiert:

- Welchen Einfluss hat der selektive MR-Antagonismus auf die Morbidität und Mortalität?
- Wie wird die hämodynamische Funktion durch die selektive MR-Blockade beeinflusst?
- In welchem Maße hat die Therapie mit einem selektiven MR-Antagonisten Einfluss auf die myokardiale Entzündungsreaktion und Apoptose?
- Wie modifiziert die selektive MR-Blockade das myokardiale Remodeling?

2 Material und Methodik

Im folgenden Abschnitt werden die verwendeten Materialien und angewandten Methoden beschrieben. Die praktischen Tätigkeiten der vorliegenden Arbeit wurden zwischen November 2006 und Februar 2010 durchgeführt. Zunächst wird auf das verwendete Versuchsmodell und den Versuchsablauf eingegangen. Im Anschluss wird die Durchführung der hämodynamischen Messungen mittels Konduktanzkatheter erläutert. Hiernach folgend werden die durchgeführten molekularbiologischen Methoden beschrieben. Diese umfassen die Ermittlung der mRNA-Expression mit Hilfe der quantitativen Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (qPCR), die Bestimmung der Enzymaktivität ausgewählter MMPs mittels Zymographie und die Quantifizierung der Proteinexpression im Gewebe durch immunhistochemische Färbungen.

2.1 Studiendesign

Zur Untersuchung der Fragestellungen dieser Arbeit wurde ein Virus-induziertes murines Myokarditis-Modell verwandt. Hierfür wurden SWR/J-Mäuse mit CVB3 infiziert. Die Experimente der vorliegenden Arbeit (Antragsnummer: G0136/04) wurden durch das Landesamt für Gesundheit und Soziales (LaGeSo) Berlin genehmigt. Alle Versuche unterlagen der Richtlinie „*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*“ der Nationalen Gesundheitsinstitute der USA (NIH)¹⁷³.

Die vorliegende Arbeit wurde als Pilotstudie konzipiert, weshalb keine Stichprobenumfangsschätzung durchgeführt wurde. Unter dem Aspekt des Tierschutzes wurde für die Auswertung eine Gruppengröße von 8 Tieren pro Untergruppe angestrebt.

2.1.1 Das Virus

Das CVB3 ist für seine Kardiotropie bekannt. Der in dieser Arbeit verwendete Virusstamm *Nancy strain* (ATCC VR-30) war zuvor in „HeLa“-Zellen, einer humanen Zelllinie aus Epithelzellen eines Zervixkarzinoms einer Patientin aus den 50er Jahren des letzten Jahrhunderts, kultiviert und bis zur Verwendung konstant bei -80°C gelagert worden. Es wurde von Herrn Prof. Dr. med. Heinz Zeichardt, Institut für Virologie, Charité Universitätsmedizin Berlin-Campus Benjamin Franklin zur Verfügung gestellt. Kurz vor der Infektion wurde es in einem Wasserbad schonend auf 37°C erwärmt und anschließend mit Phosphat-gepufferte-Salzlösung (PBS: *phosphate buffered saline*) verdünnt. Die zu infizierenden Tiere erhielten schließlich 5×10^4 Plaque-bildende

Einheiten (PFU: *plaque forming unit*) CVB3, welches in 0,2 mL 1x PBS gelöst war, intraperitoneal injiziert. Die Kontrolltiere erhielten das entsprechende Volumen an PBS.

2.1.2 Die Versuchstiere und die Versuchsbedingungen

Die Haltung der Tiere erfolgte während des gesamten Versuchszeitraums im S2-Sicherheitsbereich der Forschungseinrichtung für experimentelle Medizin (FEM) der Charité. Als Versuchstiere kamen 6-8 Wochen alte, männliche SWR/J-Mäuse zum Einsatz, die vom Jackson Laboratory (Bar Harbour, Maine, USA) bezogen wurden. Zum Versuchsbeginn wogen die Tiere im Mittel $18,75 \pm 0,15$ g. Gruppen von 3-5 Mäusen wurden in transparenten Polycarbonattierkäfigen auf sterilisiertem und staubfreiem Weichholzgranulat gehalten. Um den Einfluss von Umweltfaktoren auf den Energiestoffwechsel und die Nahrungsaufnahme zu minimieren, wurde auf annähernd konstante Umweltbedingungen (Raumtemperatur: $22 \pm 2^\circ\text{C}$, geregelte Zu- und Abluft, relative Luftfeuchtigkeit: $55 \pm 5\%$, 12-stündige Lichtphase: 07:00-19:00 Uhr täglich und konstanter Verabreichungszeitpunkt von Medikament/ Plazebo: 09:00 Uhr täglich) geachtet. Den Versuchstieren standen sterilisiertes Altromin-132®-Alleinfutter und Wasser *ad libitum* zur Verfügung. Vor dem Beginn des Versuchs wurde den Mäusen eine Akklimatisationszeit von 7 Tagen gewährt.

2.1.3 Medikament und Plazebo

Der zu untersuchende selektive MR-Antagonist Eplerenon wurde uns freundlicherweise durch die Firma Pfizer (New York, USA) in hochreiner Form zur Verfügung gestellt. Für die Applikation wurde das Verum täglich neu portioniert und in sterilisiertem Wasser gelöst. Die mit dem selektiven MR-Blocker therapierten Mäuse erhielten eine gewichtsadaptierte Tagesdosis von 200 mg/kg Körpergewicht (KG). Den Kontrolltieren wurde täglich sterilisiertes Wasser als Plazebo verabreicht.

2.1.4 Gruppeneinteilung

Die Versuchstiere wurden in vier Gruppen eingeteilt. Es wurde darauf geachtet, dass nur Tiere aus dem gleichen Wurf gemeinsam in einem Käfig gehalten wurden. Die Gruppen wurden getrennt voneinander gehalten. Zwei Gruppen wurden mit dem CVB3 infiziert. Die anderen beiden Gruppen wurden scheininfiziert. Jeweils eine CVB3-infizierte und eine scheininfizierte Gruppe wurden dem Verum- beziehungsweise Plazeboversuchsarm zugewiesen. Nach 8 Versuchstagen wurden jeweils 8 Tiere pro Gruppe der

Untersuchung zugeführt. Die verbliebenen Mäuse wurden nach einer Versuchsdauer von 28 Tagen untersucht.

Da die Versuchstiere in zwei Chargen geliefert wurden, wurden zwei Versuchsreihen unter identischen Bedingungen seriell durchgeführt. Während der ersten Versuchsreihe zeigte sich eine Mortalität der CVB3-infizierten Tiere von ca. 40%. Die Mortalität war im Verum- und Plazeboversuch arm etwa gleich. Da am Ende beider Versuchszeiträume jede Gruppe 8 Mäuse zur Auswertung umfassen sollte, entschieden wir uns zur 40%igen Erhöhung der Anzahl der CVB3-infizierten Tiere während der zweiten Versuchsreihe. Für die vorliegende Arbeit wurden 76 Tiere eingesetzt. Insgesamt starben 11 CVB3-infizierten Mäuse während der ersten 8 Versuchstage, 6 Tiere im Plazebo- und 5 Tiere im Verumarm. 1 CVB3-infiziertes Tier des Plazeboarms starb zwischen dem 8. und 28. Versuchstag. Die genaue Einteilung und die Abkürzungen der Gruppen können der Tabelle 3 entnommen werden.

Tabelle 3 - Einteilung und Abkürzung der Gruppen.

n: Anzahl.

Gruppenbezeichnung	Tieranzahl (n = 76)	Beschreibung
Therapiedauer: 8 Tage (n = 32)		
CO 8d	n = 8	Plazebo-Therapie, Scheininfektion
E+ 8d	n = 8	Eplerenon-Therapie, Scheininfektion
CVB+ 8d	n = 8	Plazebo-Therapie, Infektion mit CVB3
CVB+/ E+ 8d	n = 8	Eplerenon-Therapie, Infektion mit CVB3
Vorzeitig verstorbene Tiere: n = 11 (CVB+ 8d: n = 6; CVB+/E+ 8d: n = 5)		
Therapiedauer: 28 Tage (n = 32)		
CO 28d	n = 8	Plazebo-Therapie, Scheininfektion
E+ 28d	n = 8	Eplerenon-Therapie, Scheininfektion
CVB+ 28d	n = 8	Plazebo-Therapie, Infektion mit CVB3
CVB+/ E+ 28d	n = 8	Eplerenon-Therapie, Infektion mit CVB3
Vorzeitig verstorbene Tiere: n = 1 (CVB+ 28d: n = 1; CVB+/E+ 28d: n = 0)		

2.1.5 Versuchsablauf

Nach der Akklimation wurden die Tiere am Tag 0 des Versuches entsprechend ihrer Gruppeneinteilung durch einmalige intraperitoneale Injektion mit CVB3 infiziert oder mit PBS scheininfiziert. Zusätzlich wurden die Tiere gewogen. Am 1. postinfektösen Tag

begann entsprechend der Gruppenzuordnung die tägliche Applikation des selektiven MR-Antagonisten Eplerenon bzw. des Placebos. Die Verabreichung erfolgte *per gavage* („Schlündeln“), das heißt das Verum bzw. Placebo wurde mit einer atraumatischen Kanüle transösophageal direkt in den Magen appliziert. Diese Form der Applikation sicherte die individuelle gewichtsadaptierte Therapieapplikation. Am Versuchsende nach 8 bzw 28. Tagen wurden die Mäuse erneut gewogen, hämodynamisch, wie in Abschnitt 2.2 beschrieben, untersucht, euthanasiert und ihre Organe zur weiteren Untersuchung, wie in Abschnitt 2.3 beschrieben, gewonnen und asserviert.

2.2 Hämodynamische Untersuchungen

Zur Untersuchung der Hämodynamik wurden die Herzfrequenz sowie die Volumina und Drücke im linken Ventrikel ermittelt. Die Drücke wurden direkt über einen Drucksensor abgeleitet. Die Bestimmung der linksventrikulären Volumina erfolgte indirekt durch Messung der Konduktanz¹⁷⁴. Als Konduktanz wird der Kehrwert des elektrischen Widerstandes R bezeichnet. Da der elektrische Widerstand und somit auch die Konduktanz eines Körpers von dessen Volumen abhängt, kann durch die Ermittlung der Konduktanz des Blutes auf die linksventrikulären Volumina geschlossen werden.

Für die Messungen wird ein Konduktanzkatheter in den linken Ventrikel eingebracht. Dieser besteht aus einem Drucksensor, welcher die Drücke ableitet und auch Rückschlüsse auf die Herzfrequenz ermöglicht, und Elektroden zur Konduktanz-Bestimmung. Hierfür wird durch Applikation eines konstanten Stroms über ein Elektrodenpaar ein elektrisches Feld generiert, welches durch ein anderes Elektrodenpaar kontinuierlich gemessen wird. Während des Herzzyklus ändert sich das linksventrikuläre Volumen. Mit ihm verändert sich auch der elektrische Widerstand und entsprechend auch die Konduktanz des Blutes. Von der kontinuierlich ermittelten Konduktanz kann somit im Umkehrschluss auf das Blutvolumen im linken Ventrikel geschlussfolgert werden. Berücksichtigt werden muss hierbei jedoch, dass die gemessene Konduktanz nicht nur durch das Blut, sondern auch durch umgebende Strukturen wie dem Gewebe des linken Ventrikels, Fett oder Lungengewebe beeinflusst wird. Die nicht durch das Blut im linken Ventrikel bedingte Konduktanz bezeichnet man daher als Parallel-Konduktanz. Dieses kann durch die vorübergehende Änderung der Konduktanz des Blutes ermittelt werden. Hierfür wird eine hyperosmolare Kochsalzlösung in das venöse Blutsystem injiziert. Durch die anschließend zu detektierende Änderung der Gesamt-Konduktanz kann auf die konstant bleibende

Parallel-Konduktanz geschlossen werden¹⁷⁵. Um schließlich das intraventrikuläre Volumen zu bestimmen, muss vom ermittelten Gesamtvolumen das durch Parallel-Konduktanz-bedingte Volumen abgezogen werden. Das Volumen $V(t)$ im linken Ventrikel wird somit zu jedem Zeitpunkt durch folgende Formel beschrieben:

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

Hierbei sind a eine dimensionslose Konstante, L der Abstand der Elektroden voneinander, σ die Leitfähigkeit des Blutes, $G(t)$ die gemessene gesamte Konduktanz zu jedem Zeitpunkt und $V(c)$ ein Korrektur-Volumen aufgrund von Parallel-Konduktanz.

Da zur Erlangung valider und reproduzierbarer Messergebnisse Erfahrung und Routine bei der Durchführung der hämodynamischen Untersuchungen notwendig ist, wurden die hämodynamischen Messungen und deren Auswertungen von den zwei hierin routinierten Untersuchern PD Dr. med. Alexander Riad und Prof. Dr. med. Dirk Westermann durchgeführt.

Die Tiere wurden zunächst durch eine gewichtsadaptierte intraperitoneale Injektion von Thiopental (125 $\mu\text{g/g}$ KG) analgosediert. Durch das Setzen von Schmerzreizen wurde die Narkosetiefe überprüft und ggf. weiter vertieft. Um eine Myokardischämie, durch eine Apnoe unter Thiopentalsedierung und somit eine Analysenverfälschung zu verhindern, erfolgten die Intubation und kontinuierliche Beatmung. Die Versuchstiere wurden hierfür mit einer Kunststoffkanüle intubiert und mittels Beatmungsgerät *Maus-Ventilator Typ 55-7066* (Harvard Apparatus, Holliston, Massachusetts, USA) mit einer Beatmungsfrequenz von 160/min und einem Atemhubvolumen von 0,01 cm^3/g KG ventilert. Die so analgosedierten Mäuse wurden auf einem Präparierbrett fixiert. Ihr Brustraum wurde durch eine linksparasternale Thorakotomie mit Resektion der unteren Rippen eröffnet. Anschließend wurde das Herz für die Messungen freipräpariert. Mit einer 20 Gauge (G) Kanüle wurde dann der linke Ventrikel punktiert und anschließend ein 1,4 French (F) Mikrokonduktanzkatheter *ARIA SPR-719* (Millar-Instruments, Houston, Texas, USA) in ihm platziert. Zur Vermeidung eines starken Blutverlustes, welcher die hämodynamischen Messungen beeinflusst hätte, erfolgte der Eingriff so schonend wie möglich und etwaige Blutungen wurden sofort koaguliert. Um eine respirationsbedingte Beeinflussung zu vermeiden erfolgten die anschließenden Aufzeichnungen der Druck-Volumen-Kurven in kurzzeitiger Apnoe. Zunächst wurde die Druck-Volumen-Kurve zur

Evaluation der linksventrikulären Basisfunktion in Ruhe aufgezeichnet. Anschließend wurde ein venöser Bolus von 10 μ L 10%-iger Kochsalz-Lösung verabreicht. Durch die hierdurch ermittelte Parallel-Konduktanz wurde die Messung dann kalibriert. Zum Schluss wurden die vorlastunabhängigen Parameter mittels Vena-Cava-Okklusions-Methode ermittelt. Durch das Abklemmen der Vena cava inferior gelang es, das Herz vom Einfluss der Vorlast zu befreien. Die anschließende Auswertung der Druck-Volumen-Kurven erfolgte mit dem Programm CircLab (GTX Medical Software, Zoetermeer, Niederlande). Die ermittelten Parameter sind in Tabelle 4 aufgelistet.

Während der hämodynamischen Untersuchungen verstarben 9 Tiere vor der erfolgreichen Beendigung der Messungen. Diese wurden deshalb zur hämodynamischen Analyse nicht herangezogen. Für die Auswertung der kardialen Hämodynamik wurden somit in den Gruppen CO 8d und E+ 8d jeweils 5 Mäuse, in der Gruppe CVB+ 8d 6 Mäuse und in der Gruppe CVB+/E+ 8d 7 Mäuse berücksichtigt. Alle anderen Gruppen umfassten jeweils 8 Tiere.

Tabelle 4 - Hämodynamisch bestimmte Parameter.
Parameter mit Abkürzungen und Einheiten.

	Abkürzung	Einheit
Globale Funktion:		
- Herzfrequenz (Anzahl der Herzschläge/ Minute)	HF	min ⁻¹
- systolischer arterieller Blutdruck	SAP	mm Hg
- linksventrikuläres endsystolisches Volumen	LVESV	μ L
- linksventrikuläres enddiastolisches Volumen	LVEDV	μ L
- linksventrikuläres Schlagvolumen (LVESV – LVEDV)	SV	μ L
- Herzzeitvolumen (HF x SV)	HZV	mL/min
- linksventrikuläre Ejektionsfraktion (SV / LVEDV x 100)	LVEF	%
Systolische Funktion:		
- linksventrikulärer systolischer Druck	LVP	mm Hg
- maximale linksventrikuläre Druckanstiegsgeschwindigkeit (ermittelt durch die 1. Ableitung der Druckanstiegskurve während der Systole)	dP/dt_{max}	mm Hg/s
Diastolische Funktion:		
- linksventrikulärer enddiastolischer Druck	LVEDD	mm Hg
- maximale linksventrikuläre Druckabfallsgeschwindigkeit (ermittelt durch die 1. Ableitung der Druckabfallskurve während der Diastole)	dP/dt_{min}	mm Hg/s

2.3 Gewinnung und Konservierung der Proben

Nach der hämodynamischen Messung wurden die Tiere euthanasiert und das Herz sowie die Lungen unter sterilen Bedingungen entnommen. Das Herz wurde anschließend gewogen. Zuvor waren die Atrien auf der atrioventrikulär Ebene abgetrennt und das verbliebene intraventrikuläre Blut mit 1x PBS heraus gespült worden. Nach dem Wiegen wurden die linken Ventrikel in 3 gleiche Teile aufgeteilt.

Eine Probe wurde für die Dauer von 24 h in neutral gepufferter, 4%iger Formalin-Lösung fixiert und in Paraffin eingebettet. Mithilfe eines Gewebereinbettungsautomaten (Shandon, Frankfurt/Main, DE) wurden sie hierfür zweimal 1 h mit 70% Ethanol (v/v), dreimal 2 h mit 96% Ethanol (v/v), zweimal 1 h mit 100% Ethanol, einmal 1 h mit 66% Ethanol in Xylol (v/v), einmal 1 h mit 33% Ethanol in Xylol (v/v) und einmal 1 h mit Xylol behandelt und dann zweimal 2 h in *Paraplast*® bei 56°C eingebettet. Die so entstandenen Paraffinblöcke wurden dunkel bei 4°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Das zweite Stück wurde in das Medium Tissue Tec® (Sakura, Tokyo, Japan) eingebettet, mittels flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bis zur Weiterverwendung bei -80°C gelagert.

Das verbliebene dritte Stück wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Die Lungen wurden zur Ermittlung einer möglichen kardial bedingten pulmonalvenösen Stauung unmittelbar nach der Entnahme und nach einer 3-tägigen Trocknung unter Zugluft gewogen.

Die gesamte Gewinnung und Konservierung der Proben erfolgten unter sterilen Bedingungen, um eine Kontamination mit Fremdstoffen zu vermeiden.

2.4 RNA-Transkriptionsanalysen

Für die Analyse der RNA-Transkription wurde die RNA zunächst aus dem Gewebe extrahiert und gereinigt. Anschließend wurde sie in komplementäre Desoxyribonukleinsäuren (cDNA: *complementary-deoxyribonucleic acid*) revers transkribiert und schließlich mittels qPCR quantifiziert. Die Kombination aus reverser Transkription und qPCR wird auch als RT-qPCR bezeichnet.

2.4.1 Extraktion und Reinigung der RNA

Die Extraktion der RNA erfolgte unter Zuhilfenahme der leicht modifizierten *Single-Step*-Methode von Chomczynski^{176,177}. Hierfür wurden jeweils 30 mg der unfixierten, bei -80°C

gelagerten Myokardproben verwendet. Die gefrorenen Gewebstücke wurden mit 800 µL *Trizol*® versetzt und mittels *Pellet Pestles*® homogenisiert. Durch das *Trizol*® wurden die Zellen lysiert und die Proteine denaturiert. Die RNA-Struktur blieb jedoch unverändert. Nach einer 5-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden 160 µL Chloroform hinzugefügt. Der Ansatz wurde geschüttelt und dann 15 min bei 12.000 g und 4°C zentrifugiert. Hierdurch kam es zur Separierung des Homogenisates in 3 Phasen. Die obere wässrig-durchsichtige Phase enthielt die extrahierte RNA. Sie wurde entnommen und mit 400 µL Isopropanol versetzt. Nach 10-minütiger Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde das Gemisch 10 min bei 12.000 g und 4°C zentrifugiert. Dabei kam es zur Ausfällung der RNA in Form von Pellets am Boden des Reaktionsgefäßes. Der nicht mehr benötigte Überstand wurde verworfen. Zur weiteren Verarbeitung wurden die RNA-Pellets mit 100 µL *RNAse-freiem Aqua dest.* vorsichtig resuspendiert. Die so extrahierte RNA wurde anschließend mittels *RNeasy-Kit*®, bei dem die Silicagel-Membran-Technik mit Mikrozentrifugationstechnik kombiniert wird, weiter gereinigt. Hierfür wurde der RNA-Suspension 350 µL *RLT-Puffer*, 3,5 µL β-Mercapto-Ethanol und 250 µL Ethanol hinzugefügt. Nach gutem Vermengen wurde das Gemisch auf die *RNeasy Mini-Spin*®-Säule aufgetragen und 15 s bei Raumtemperatur und 10.000 U/min zentrifugiert. Dabei wurde die RNA an die Membran der Säule gebunden. Die restlichen Bestandteile wurden herauszentrifugiert und anschließend verworfen. Durch Substitution von 350 µL *RW1-Waschpuffer* und 15-sekündigem Zentrifugieren bei 10.000 U/min und Raumtemperatur wurde die Säule gewaschen. Zur Eliminierung eventuell verbliebener Desoxyribonukleinsäure (DNA: *deoxyribonucleic acid*)-Reste wurde das *RNAse-free DNase-Set*®, bestehend aus einem Gemisch von 10 µL DNase und 70 µL *RDD-Puffer*, auf die Säulen gegeben. Während des folgenden Waschens der Säulen wurden zuerst 350 µL *RW1-Waschpuffer* auf die Säule aufgetragen. Diese wurden dann 15 s bei Raumtemperatur mit 10.000 U/min zentrifugiert. Nachfolgend wurde 50 µL *RPE-Puffer* auf die Säule gegeben und diese wurde bei Raumtemperatur mit 10.000 U/min 2 min zentrifugiert. Durch erneute einminütige Zentrifugierung bei Raumtemperatur und 10.000 U/min wurden die Säulen getrocknet, bevor die gereinigte RNA mittels 80 µL *RNAse-freiem Aqua dest.* und durch erneute 1-minütige Zentrifugation bei 12.000 U/min eluiert wurde. Anschließend wurde zur Ermittlung der RNA-Konzentration 1 µL jeder Probe photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm mit Hilfe des *ND-1000 Spektrophotometers* (NanoDrop Technologies Inc., Wilmington, Delaware, USA) untersucht.

2.4.2 Reverse Transkription

Zur Überführung der RNA in cDNA wurde das *High-Capacity-cDNA-Archive-Kit*® verwendet. Dieses enthielt die Reverse Transkriptase des *Moloney-Murine-Leukemia-Virus*, eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, welche komplementär zu den RNA-Einzelsträngen die cDNA-Einzelstränge bildet. Je 1,5 µg RNA wurde auf ein Volumen von 50 µL mit RNase-freiem Wasser aufgefüllt und anschließend mit 50 µL *2x RT-Mastermix*, bestehend aus 10 µL *10x Reverse Transkriptions-Puffer*, 4 µL *25x dNTP-Mix*, 10 µL *10x Random-Primer*, 5 µL *MultiScribe Reverse Transkriptase* (50 U/µL) und 21 µL RNase-freiem Wasser, versetzt. Das Gemisch wurde mittels *PCR-Mastercycler gradient* (Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, DE) für 10 min auf 25°C und dann für 120 min auf 37°C erwärmt. Schließlich erfolgte eine Erhitzung für 8 s auf 85°C. Dies führte zur Zerstörung der RNA und der an Reaktion beteiligten Enzyme. Die cDNA überstand diesen letzten Schritt und wurde bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.4.3 Quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (qPCR)

Um mit diesem Verfahren die Menge einer vorliegenden RNA zu quantifizieren, muss diese zuvor in cDNA umgewandelt werden. Das Prinzip der qPCR geht auf Higuchi *et al.* zurück¹⁷⁸. Es beruht auf dem von Mullis *et al.* entwickelten Prinzip der Polymerasekettenreaktion (PCR), bei der die zu replizierende DNA *in vitro* exponentiell amplifiziert wird¹⁷⁹. Es besteht aus drei sich wiederholenden Einzelschritten: Denaturierung, Primerhybridisierung und Elongation. Das Prinzip ist in Abbildung 2 schematisch dargestellt. Durch die Ergänzung von Farbstoffen oder Sonden, deren Fluoreszenzemission während der Amplifikation direkt proportional zur DNA-Menge zunimmt, kann auf den initialen DNA-Gehalt geschlossen werden. In dieser Arbeit wurde das *TaqMan*®-System (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornien, USA) zur Echtzeitquantifizierung der DNA verwendet. Beim *TaqMan*®-System bindet eine spezifische Sonde während der Primerhybridisierung komplementär an die Zielsequenz des Matrizenstrangs. Sie besitzt 2 Bestandteile: den *Reporter*, ein Fluoreszein-Derivat und den *Quencher*, ein Rhodamin-Derivat. Damit die Sonde nicht als Primer fungiert, ist der *Quencher* am 3'-Ende phosphoryliert. Im Grundzustand sind *Reporter* und *Quencher* räumlich eng gelagert, so dass die Fluoreszenzenergie des *Reporters* mittels Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer auf den *Quencher* übertragen wird und eine Fluoreszenz unterdrückt wird. Stößt die *AmpliAq-DNA-Polymerase* des *TaqMan*®-Systems während der Elongationsphase auf eine Sonde, wird diese entfernt und

gespalten. Hierdurch werden *Reporter* und *Quencher* räumlich getrennt. Der *Reporter* kann nun fluoreszieren. Dies wird durch das *TaqMan*[®]-System detektiert. Mit steigender PCR-Zykluszahl nimmt die Anzahl der Amplifikate und fluoreszierenden *Reporter* direkt proportional zu.

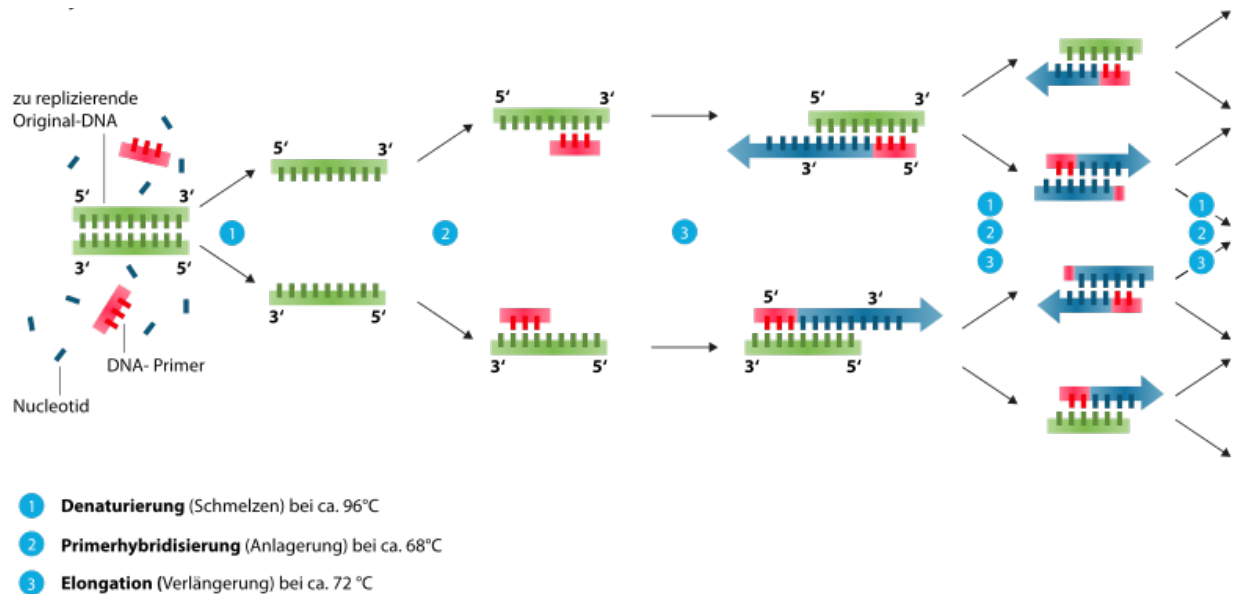


Abbildung 2 - Ablauf einer PCR.

Amplifikation durch Wiederholung der 3 Einzelschritte:

(1) Denaturierung: Durch Erhitzung werden die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den komplementären Basen aufgehoben, wodurch DNA-Einzelstränge entstehen.

(2) Primerhybridisierung: Anlagerung sequenzspezifischer Oligonukleotide, sogenannter Primer, an die Einzelstränge. Zur Amplifizierung eines bestimmten DNA-Bereiches werden 2 flankierende Primer benötigt.

(3) Elongation: Ausgehend von den Primern erfolgt komplementär zur DNA-Einzelstrang-Matrize in 3'-Richtung die Polymerisation des Gegenstrangs. Dies erfolgt durch die Taq-Polymerase aus dem Bakterium *Thermus aquaticus*, welches die folgende Denaturierung unbeschadet übersteht.

(Bildquelle: <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=24766511> am 10.10.2016 um 9.00 Uhr)

Um auf die ursprüngliche DNA-Menge zu schließen, wird der *threshold-cycle*-(C_t)-Wert ermittelt. Dieser beschreibt den Übergang der Fluoreszenz vom Hintergrundsignal zum exponentiellen Signalanstieg. Durch Subtraktion der C_t -Werte des untersuchten Gens und eines Haushalts- (*Housekeeping*)-Gens kann ΔC_t ermittelt werden. Durch die Formel:

$$E_z = 2^{-\Delta C_t}$$

wird dann die relative Expression des Zielgens (E_z) berechnet.

In der vorliegenden Arbeit wurden für alle Genexpressionsanalysen jeweils 1 μ L der zu untersuchenden cDNA, 10 μ L *TaqMan*[®] *Universal PCR Master Mix*, 8 μ L DNase-freies *Aqua dest.* und 1 μ L des jeweiligen *TaqMan*[®] *Gene Expression Assay's* verwendet. Mit Hilfe des *AbiPrism*[™] *7900HT Sequence Detection Systems* (Applied Biosystems, Foster

City, Kalifornien, USA) wurden die PCR (Initialphase: 10 min bei 95°C zur Denaturierung und Aktivierung; anschließend im Wechsel: 10 s Denaturierung bei 95°C und 1 min Primerhybridisierung sowie Elongation bei 60°C) und die Fluoreszenzmessung parallel durchgeführt. Alle Amplifikationen wurden doppelt bestimmt und deren Mittelwert verwendet. Als *Housekeeping*-Gen wurde der *cyclin-dependent kinase inhibitor 1B* (CDKN 1B) genutzt, für welches im Myokard keine Expressionsregulation nachgewiesen werden konnte¹⁸⁰. Die verwendeten *TaqMan*® *Gene Expression Assays* sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

Bei der Auswertung der RNA-Transkriptionsanalysen zeigte sich für jeweils 1 Tier der Gruppen CVB+ 8d und CVB+ 28d intraindividuelle Abweichungen zwischen den doppelt bestimmten Werten von mehr als 20%. Aufgrund dieser Diskrepanzen, die mutmaßlich einer Verunreinigung oder einem Pipettierfehler geschuldet waren, wurden diese beiden Tiere von den Genexpressionsanalysen ausgeschlossen. Konsekutiv bestanden während der RNA-Transkriptionsanalyse die Gruppen CVB+ 8d und CVB+ 28d nur aus jeweils 7 Mäusen.

Tabelle 5 - Verwendete TaqMan® Gene Expression Assays.

Dargestellt sind die untersuchten Gene mit der jeweiligen Assay-Identifikationsnummern.

Gen	Assay-Identifikationsnummer	Gen	Assay-Identifikationsnummer
ANP	Mm01255747_g1	TIMP-1	Mm01341361_m1
Col I	Mm01302043_g1	TIMP-2	Mm00441825_m1
Col III	Mm01254467_m1	TIMP-4	Mm00446568_m1
MMP-2	Mm01253621_m1	CCN2	Mm01192933_g1
MMP-3	Mm01168406_g1	TNF- α	Mm00443258_m1
MMP-8	Mm00772335_m1	TGF- β	Mm00436955_m1
MMP-9	Mm00600164_g1	IL-6	Mm00446190_m1
MMP-12	Mm00500554_m1	IL-10	Mm00439616_m1
MMP-13	Mm01168713_m1	CDKN 1B	Mm00438168_m1

2.4.4 Bestimmung der Viruslast

Die Bestimmung der myokardialen Viruslast erfolgte analog zu den Genexpressionsanalysen. Der initialen reversen Transkription der Virus-RNA schloss sich eine qPCR mit dem *TaqMan*®-System an. Zur Quantifizierung der CVB3-Viruslast wurde ein CVB3-cDNA-Standard-Plasmid mit einer Replikationsrate von 1×10^5 Kopien als Vergleich verwendet. Jeweils 4 μ L cDNA der Probe bzw. des Standard-Plasmids

wurden zu 12,5 µL *TaqMan® Universal PCR Master Mix*, 1 µL des *forward*-Primers, 1 µL *reverse*-Primers, 1 µL MGB-TaqMan-Sonde und 5,5 µL RNAase-freies *Aqua dest.* gegeben. Die Sequenzen und Bezugsquellen der CVB3-spezifischen Primer und Sonde können Tabelle 6 entnommen werden. Die qPCR mit dem *AbiPrism™ 7900HT Sequence Detection System* wurde analog zu den Genexpressionsanalysen durchgeführt. Anschließend konnte aufgrund des verwendeten CVB3-cDNA-Standard-Plasmids die Viruslast der einzelnen Proben ermittelt werden.

Tabelle 6 - Verwendete Primer und Sonde zur Bestimmung der Viruslast.

Dargestellt sind die Primer und Sonde zur Bestimmung der Viruslast nebst Sequenz und Bezugsquelle.

Primer/ Sonde	Sequenz	Bezugsquelle
<i>forward</i> -Primer	CCCTGAATGCGGCTAATCC	TIB-Molbiol, Berlin, DE
<i>reverse</i> -Primer	ATTGTCACCATAAGCAGCCA	TIB-Molbiol, Berlin, DE
MGB-TaqMan-Sonde	5'-TGCAGCGGAACCG	Applied Biosystems, Foster City, Kalifornien, USA

2.5 Aktivitätsbestimmung von MMP-2 und MMP-9 mittels Zymographie

MMP-2 und MMP-9 sind wichtige MMPs im Rahmen der myokarditischen Pathogenese. Da ihre Enzymaktivität vielfältigen Einflüssen unterliegt, wurde für sie mittels Zymographie bestimmt. Zuvor wurden die Proteine aus dem Myokard extrahiert.

2.5.1 Proteinextraktion und -quantifizierung

Die Proteinextraktion aus dem Gewebe erfolgte mittels Radioimmunpräzipitationstest (RIPA: *Radioimmunoprecipitation-Assay*)-Puffer, der aus 1% Nonidet P-40 (v/v), 0,5% Natriumdesoxycholsäure (w/v), 0,1% Natriumdodecylsulfat (SDS) (w/v) und 98,4% 1x PBS (v/v) besteht. Zur Vermeidung von Proteinmodifikationen durch endogene Proteasen und Phosphatasen wurden Protease- und Phosphatase-Inhibitoren im Verhältnis 1:100 hinzugefügt. Zu je 15 g unfixiertem, -80°C tiefgefrorenem Myokardgewebe wurden 230 µL RIPA-Puffer gegeben und anschließend mit dem *Pellet Pestles®* auf Eis homogenisiert. Nach einer Zentrifugation für 15 min mit 13.200 U/min bei 4°C enthielt der Überstand die extrahierten Proteine. Er wurde abpipettiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Zur Quantifizierung der extrahierten Proteine wurde das *BCA-Protein-Assay-Kit®* verwendet. Dieses beruht auf einer von Lowry *et al.* beschriebenen Methode¹⁸¹. Während des ersten Schritts bilden Kupfer(II)-Ionen in alkalischem Milieu Komplexe mit

Peptidverbindungen. Im zweiten Schritt reagieren diese Kupfer(II)-Ionen mit den Proteinen zu Kupfer(I)-Ionen. Diese bilden mit der im Assay enthaltene Bicinchoninsäure violette Komplexe, die photometrisch bei einer Wellenlänge von 562 nm quantifiziert werden¹⁸². Entsprechend dem Herstellerprotokoll wurde die BCA-Arbeitslösung, bestehend aus *Reagenz A* und *Reagenz B*, in der Konzentration 50+1, hergestellt. Je 3 µL der zu quantifizierenden Proteinprobe wurde schonend aufgetaut mit 150 µL *Aqua bidest.* verdünnt. Da der Proteingehalt später von einer Eichkurve abgeleitet werden sollte, wurde zur Erstellung der Eichkurve eine Verdünnungsreihe mit bekannten Konzentrationen bovines Serumalbumins angelegt. Zu je 10 µL Probe, respektive verdünntem bovines Serumalbumin, wurden 200 µL BCA-Arbeitslösung gegeben. Dieses Gemisch wurde luft- und wasserdicht verschlossen und 30 min bei 60°C im Wasserbad inkubiert. Mit dem *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA)-Messegerät *Sunrise Absorbance Reader* (Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz) wurde die Absorption bestimmt und unter Zuhilfenahme der Eichkurve auf die Proteinkonzentration geschlussfolgert. Alle Bestimmungen erfolgten im Doppelansatz.

2.5.2 Zymographie

Die Zymographie dient der spezifischen Aktivitätsbestimmung proteolytischer Enzyme. Sie besteht aus 2 Schritten: der Gelelektrophorese, bei der die Proteine der Größe nach aufgetrennt werden, und dem Substratverdau, bei dem die jeweilige Enzymaktivität quantifiziert wird¹⁸³. Die Auftrennung der Eiweiße erfolgte mit Hilfe der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE). Das Detergenz SDS bindet an die Proteine, denaturiert sie und maskiert die individuellen Ladungen ihrer Aminosäuren. Da es anionisch ist, wandern die Proteine während der Elektrophorese von der Kathode zur Anode und werden entsprechend ihres Molekulargewichts aufgetrennt. Für den 2. Schritt enthält das Polyacrylamidgel Gelatine, die als Substrat von den zu untersuchenden Proteasen MMP-2 und MMP-9 verdaut wird. Die zuvor denaturierten Proteine werden hierfür durch das Detergenz *Triton X-100* wieder renaturiert. Nach dem Verdau kann durch die Anfärbung der Substratreste auf die Enzymaktivität geschlossen werden. Durch die elektrophoretische Auftrennung kann diese dann einer Protease zugeordnet werden. Die Bande bei 72 kDa entspricht der MMP-2-Aktivität und die Bande bei 90 kDa der MMP-9-Aktivität.

Das in dieser Arbeit eingesetzte 10%ige Polyacrylamidgel enthielt einen Anteil von 0,1% Gelatine. In die Taschen an der Kathode des Gels wurden je 40 µg Proteinextrakt mit

20 µL Ladepuffer (50 mM Tris-HCl, 10% Glycerin (v/v), 1% SDS (w/v), 0,005% Bromphenolblau (w/v), pH 6,8) gegeben, vermischt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Als Vergleichsmarker wurden 15 µL *peqGOLD Protein-Marker V* in eine Tasche pro Gel gegeben. Die Elektrophorese erfolgte mit einem Elektrophoresepuffer (250 mM Trishydroxymethyl-aminomethan, 192 mM Glycin, 0,1% SDS (w/v), pH 8,3) bei einer Spannung von 100 V bis die Lauffront die Kathode fast erreichte. Zur Vermeidung einer Hitze-induzierten unspezifischen Spaltung der Gelatine und irreversiblen Denaturierung der Proteasen wurden Elektrophoresepuffer und Gel während der Elektrophorese gekühlt. Anschließend wurden die Gele dreimal 20 min in 2,5% *Triton X-100* schüttelnd gewaschen und hierdurch das gebundene SDS entfernt. Dem folgend wurde das Gel zweimal durch 20-minütiges Schütteln im Entwicklungspuffer (5 mM Tris-HCl, 20 mM NaCl, 0,5 mM CaCl₂, 1µM ZnCl, 0,002% NaN₃ (w/v)) erneut gewaschen. Dieser Puffer stellte Zink und Kalzium für die Aktivierung der Zink- und Kalzium-abhängigen Proteasen zur Verfügung. Schließlich wurde das Gel über Nacht (18 h) unter Schütteln und bei Raumtemperatur im Entwicklungspuffer inkubiert. Dann wurde das Gel mit Coomassie-Färbelösung (0,5% Coomassie-Blue G-250 (w/v)), die sich an der ungespaltenen Gelatine anlagert, für 3 h gefärbt. Mittels Entfärbelösung (10% Essigsäure (v/v), 30% Methanol (v/v)) wurde der überschüssige Coomassie-Farbstoff entfernt. Die entwickelten Gele wurden mit dem Transluminator *BioDoc Analyse System* (Biometra, Göttingen, Deutschland) bei Unterlicht digital abfotografiert (Blende: 4,0, Belichtungszeit: 1000 ms). Dabei wurde das Licht vom Coomassie-Farbstoff absorbiert. In Abhängigkeit von der gespaltenen Menge an Gelatine wurde das Licht nicht absorbiert und gelangte durch das Gel. Die relative Quantifizierung der Lichtmenge und somit der Gelatinaseaktivität erfolgte mit der Analysesoftware *Gel-Pro Analyzer 4.0* (Media Cybernetics, Bethesda, Maryland, USA). Da nicht alle Proben auf einem Gel untersucht werden konnten, wurde, um Unterschiede beim Ablauf der Zymographie auszugleichen, auf jedem Gel das Proteinextrakt eines Abgleichtieres aufgetragen und mit dessen Hilfe die relativen Aktivitäten der anderen Proben adjustiert. Die Enzymaktivitäten wurden als relative Aktivität auf den Mittelwert der Aktivität der Gruppe CO 8d bezogen und als Vielfaches hiervon angegeben.

2.6 Histochemische und Immunhistochemische Untersuchungen

Hierunter versteht man die selektive Darstellung von chemischen Gruppen bzw. einzelnen Proteinen in Gewebsschnitten, deren mikroskopische Analyse eine

Quantifizierung und Lokalisierung innerhalb des Gewebes respektive der Zellen ermöglicht.

2.6.1 Anfertigung von Paraffin- und Gefrierschnitten

Die in Paraffin eingebetteten Proben wurden mithilfe eines Rotationsmikrotoms in 5 µm dicke Scheiben geschnitten und in ein 50°C warmes Wasserbad überführt. Von dessen Oberfläche wurden sie überlagerungs- und luftblasenfrei auf einen Objektträger übertragen und für 15 min in einem Trockenschrank inkubiert. Dann wurden sie über Nacht bei 37°C getrocknet und bis zur weiteren Verwendung bei Raumtemperatur trocken gelagert.

Die bei -80°C gelagerten und in *TissueTec*® eingebetteten Gewebeproben wurde mit dem Kryostaten *Jung CM 3000* (Leica, Bensheim, DE) bei einer Messertemperatur von -20°C und einer Kühlkammertemperatur von -15°C in 5 µm dicke Scheiben geschnitten und auf einen Objektträger übertragen. Diese waren zuvor 5 min in 10%igem Poly-L-Lysin eingetaucht worden, um die Adhäsion der Schnitte an die Objektträger zu fördern. Dann wurden sie 10 min in reinem, 4°C kaltem Aceton fixiert und bei -20°C gelagert.

2.6.2 Sirius Red-Färbung zur Bestimmung des Gesamtkollagengehaltes

Die *Sirius Red*-Färbung ist eine Methode zur Darstellung von Kollagen I- und Kollagen III-Fibrillen im Polarisationslicht¹⁸⁴. Nach der Anfärbung leuchtet Kollagen im zirkulär polarisierten Licht hell vor dem dunklen Hintergrund, wobei dünne Fasern grün und dicke Fasern gelb oder orange schimmern¹⁸⁵.

Für diese Färbung wurden Paraffin-Schnitte verwendet, die zur Entparaffinierung dreimal 10 min in 100%igem Xylol inkubiert und anschließend mit einer absteigenden Alkoholreihe (je 5 min in 100%igem, 90%igem, 70%igem, 30%igem Ethanol (v/v) und *Aqua bidest.*) rehydriert wurden. Dann wurden die Schnitte für 1 h in der *Sirius Red*-Färbelösung, bestehend aus 1,2% Pikrinsäure (w/v) und 1% *Picrosirius Red* (w/v), unter ständigem Schütteln inkubiert. Zur Entfernung des überflüssigen *Sirius Red*-Farbstoffs wurden die Schnitte in einer 0,01 M HCl-Lösung eingelegt, mittels aufsteigender Alkoholreihe (je 5 min in 30%igem, 70%igem, 90%igem und 100%igem Ethanol (v/v)) wieder dehydriert und durch Xylol vom Ethanol befreit. Anschließend wurden die Schnitte mit xylollöslichem Corbit-Balsam eingedeckt.

2.6.3 Nachweis apoptotischer Zellen mittels TUNEL-Färbung

Mit der von Gavrieli entwickelten *Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin Nick-End Labeling*-(TUNEL)-Methode gelingt es, DNA-Fragmente, die während der Apoptose durch Endonukleasen entstehen, nachzuweisen¹⁸⁶. Hierbei koppelt das Enzym terminale Desoxynucleotidyltransferase (TdT) Biotin-markiertes Desoxyuridintriphosphat (dUTP) an die 3'OH-Enden von DNA-Fragmenten. Über (Strept-)Avidin bindet die Meerrettichperoxidase (HRP: *horseradish peroxidase*) an diese Fragmente und katalysiert die Umwandlung eines Substrates in einen Farbstoff.

Die Durchführung der Färbung erfolgte mit dem *DeadEnd™ Colorimetric TUNEL System* unter Beachtung des Herstellerprotokolls. Die Gefrierschnitte wurden 5 min in 0,85% NaCl (w/v) und 1x PBS aufgetaut und an das Puffermilieu gewöhnt. Dann wurden sie für 15 min in 10%iges, gepuffertes Formalin (v/v) verbracht und anschließend erneut 5 min in 1x PBS gewaschen. Um das Gewebe für die nachfolgend eingesetzten Enzyme permeabler zu machen, wurden die Schnitte 30 min in 0,002% Proteinase K (w/v) inkubiert. Nach erneutem 5-minütigen Waschen in 1x PBS wurden die Objektträger für 5 min mit 10%igem, gepufferten Formalin behandelt und erneut mit 1x PBS gewaschen. Anschließend wurden die Schnitte mit dem Ausgleichspuffer aus dem Kit bedeckt, bevor sie mit jeweils 100 µL *rTdT-Reaktions-Mix*, bestehend aus 98 µL Ausgleichspuffer, 1 µL biotinyliertem Nukleotid-Mix und 1 µL rekombinanten TdT, benetzt und 60 min bei 37°C inkubiert wurden. Der Reaktionsmix wurde dann mittels 15-minütigem Waschen in 2x Natrium-Zitrat-Puffer (SSC: *Standard Saline Citrate*) und zweimal 5-minütigem Waschen in 1x PBS entfernt. Um zu vermeiden, dass endogene Peroxidasen das Ergebnis verfälschen, wurden diese durch eine 5-minütige Behandlung mit 0,3%igem H₂O₂ (v/v) blockiert. Im Folgenden wurden die Schnitte mit dem (Strept-) Avidin-HRP-Komplex, der 1:500 in 1x PBS verdünnt wurde, benetzt. Nach einer Einwirkungszeit von 30 min wurden die Objektträger zweimal für 5 min in 1x PBS gewaschen. Zur Entwicklung der Färbung wurden die Schnitte 10 min in 0,05%-igem Diaminobenzidin in 1x PBS, einem Substrat der HRP, verbracht und danach einige Minuten mit *Aqua bidest.* gespült. Anschließend wurden Zellkerne und Zytoplasma durch kurzes Tauchen in Hämalaun und nachfolgend in warmem Leitungswasser gegengefärbt. Zuletzt wurden die Schnitte mit Glyceringelatine und Deckgläsern eingedeckt. Zur Detektion etwaiger unspezifischer Anfärbungen wurden Negativkontrollen, bei denen der *rTdT-Reaktions-Mix* weggelassen wurde, mitgeführt.

2.6.4 Immunhistochemische Färbungen

Das auf Coons zurückgehende Prinzip der immunhistochemischen Färbungen besteht darin, dass Oberflächenantigene von Gewebsschnitten durch Antikörper farblich markiert werden¹⁸⁷. In der vorliegenden Arbeit wurden indirekte Darstellungsverfahren angewandt. Hierbei binden spezifische, hochaffine Primär-Antikörper an Epitope der zu analysierenden Struktur. An deren F_c-Segment binden dann Sekundär-Antikörper. Da mehrere Sekundär-Antikörper an das F_c-Segment eines Primär-Antikörpers binden können, wird die Sensitivität der Methode erhöht¹⁸⁸. An den Sekundär-Antikörper ist ein Enzym als Detektionssystem gekoppelt. In der vorliegenden Arbeit wurden die einfache indirekte, die (Strept-) Avidin-Biotin-Komplex (ABC)- und die Polymer-Methode angewandt. Die 3 Methoden sind in Abbildung 3 dargestellt und erklärt. Die verwendeten Primär- und Sekundär-Antikörper, deren Spezifikation und Verdünnung können Tabelle 7 entnommen werden.

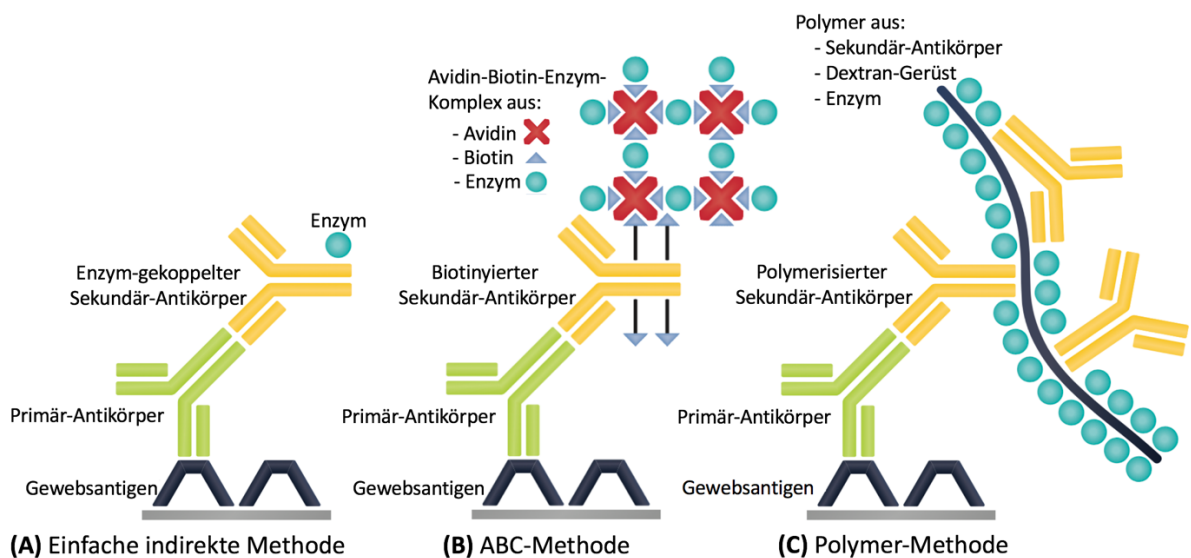


Abbildung 3 - Schema der einfachen indirekten (A), (Strept-)Avidin-Biotin-Komplex (ABC)- (B) und Polymer-Methode (C).

Der Primär-Antikörper bindet spezifisch an das Gewebsantigen. An diesen bindet (A) der Enzym-gekoppelte Sekundär-Antikörper, (B) der biotinylierte Sekundär-Antikörper, der über Avidin (4 Biotin-Bindungsstellen) mit maximal 3 biotinylierten Enzymen einen Komplex eingeht, und (C) der polymerisierte Sekundär-Antikörper, der über ein Dextran-Polymer mit mehreren Sekundär-Antikörpern und vielen Enzymen verbunden ist. Durch Bindung mehrerer Enzyme an den Sekundär-Antikörper bei der ABC- und Polymer-Methode (3 bzw. bis zu 70) wird die Sensitivität gesteigert. Modifiziert nach Peterson und Pederson¹⁸⁹.

2.6.4.1 Durchführung der einfachen indirekten Methode

Diese Methode wurde zur Färbung von ICAM-1 verwendet. Die verwendeten Primär- und Sekundärantikörper sowie die jeweiligen Verdünnungen können der Tabelle 7 entnommen werden. Die für diese Färbung verwendeten Gefrierschnitte wurden

zunächst 5 min in 1x PBS inkubiert. Anschließend wurden die einzelnen Färbefelder mit einem Glasdiamantschliff umrandet und somit die Färbefelder für einen ökonomischen Antikörpereinsatz begrenzt. Die gewebeeigenen Peroxidasen wurden durch 10-minütiges Verweilen der Objektträger in 0,075% H₂O₂ (v/v) inaktiviert. Dann wurden die Schnitte zweimal 5 min in 1x Tris-gepufferter Salzlösung (TBS: *tris buffered saline*) gewaschen. Zur Absättigung elektrostatischer Ladungen zwischen den Proteinen und zur Vermeidung unspezifischer Anfärbungen wurden die Objektträger 30 min mit einer Lösung, bestehend aus 1x TBS, Normalserum und 4 Tropfen Avidin pro verwendetem mL Lösung, benetzt. Hiernach wurden jeweils 100 µL des in 1x PBS und 10% fetales Kälber-Serum (FKS) verdünnten Primär-Antikörpers auf die Färbefelder aufgetragen und 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nicht gebundene Antikörper wurden im Anschluss durch zweimaliges 5-minütiges Waschen in 1x PBS entfernt. Nun wurde der in 1x PBS und 10% FKS verdünnte Sekundär-Antikörper auf die Färbefelder gegeben und ebenfalls 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die überschüssigen, nicht gebundenen Sekundär-Antikörper wurden dann durch 2 erneute, jeweils 5 min andauernde Waschschriffe in 1x TBS eliminiert.

2.6.4.1 Durchführung der ABC-Methode

Diese Methode wurde verwendet, um die CD3-positive und CD11b-positive Zellen sowie das vaskuläre Zelladhäsionsmolekül-1 (VCAM-1: *vascular cell adhesion molecule-1*) darzustellen. Die detaillierten Informationen über die verwendeten Primär- und Sekundär-Antikörper können Tabelle 7 entnommen werden.

Zu Beginn wurden die Gefrierschnitte zweimal mit *Aqua bidest.* äquibriert. Die einzelnen Färbefelder wurden mit einem Diamantschliff zur Ökonomisierung des Antikörperseinsatzes umrandet. Die endogenen Peroxidasen der Proben wurden anschließend durch 10-minütiges Verweilen in 0,075% H₂O₂ (v/v) blockiert. Nach zweimal 5-minütigem Waschen in 1x TBS wurden die Objektträger abhängig vom jeweils verwendeten Sekundär-Antikörper für 30 min bei Raumtemperatur mit einer Blocklösung behandelt. Diese sollte die Ladungen der Proteine absättigen und das endogene Avidin blockieren, um eine unspezifische Hintergrundfärbung zu verhindern. Sie bestand für das *ABC-Kit anti Goat-System* aus 1,5% Normalserum (v/v) und 4 Tropfen/mL Avidinblock aus dem *Avidin-Biotin-Blocking Kit* in 1x TBS und für das *Dako EO 468-System* aus 10% Normalserum (v/v), 1% BSA (v/v) und 4 Tropfen/mL Avidinblock aus dem *Avidin-Biotin-Blocking Kit* in 1x TBS. Im Anschluss wurden die Färbefelder mit 100 µL der

jeweiligen Primär-Antikörper-Lösung für 60 min bei Raumtemperatur benetzt. Diese bestand aus dem Primär-Antikörper, der wie in Tabelle 7 angegeben, mit einer Lösung aus 1% BSA (v/v), 4 Tropfen/mL Biotinblock des *Avidin-Biotin-Blocking Kit* und 1x TBS verdünnt war. Der Biotinblock verhinderte eine unspezifische Färbung des Hintergrundes durch Blockade des endogenen Biotins. Bevor die jeweiligen Sekundär-Antikörper ebenfalls 60 min einwirken konnten, wurden die Objektträger zweimal 5 min in 1x TBS gewaschen und somit von nicht gebundenen Primär-Antikörpern befreit. Entsprechend den Angaben in Tabelle 7 wurden der Sekundär-Antikörper des *ABC-Kit anti Goat-System* mit 1,5% Normalserum (v/v) in 1x TBS und der Sekundär-Antikörper des *Dako EO 468-System* mit 1% BSA (v/v) in 1x TBS verdünnt. Die nicht gebundenen biotinylierten Sekundär-Antikörper wurden durch zweimal 5-minütiges Waschen in 1x TBS entfernt. Die Schnitte wurden daraufhin für 30 min bei Raumtemperatur mit dem *ABC-Kit* benetzt, welches Komplexe aus Avidin, Biotin und dem Enzym des Detektionssystems enthielt. Die überschüssigen, nicht an Zweit-Antikörper gebundenen Komplexe wurden wiederum durch zweimal 5-minütiges Waschen in 1x TBS von den Schnitten gespült.

2.6.4.1 Durchführung der Polymer-Methode

Dieses Prinzip wurde für die Färbung von Kollagen I, Kollagen III, MMP-9 und Nitrotyrosin angewendet. Zunächst wurden die eingefrorenen Schnitte 5 min an das Puffermilieu von 1x PBS gewöhnt. Dann wurden die Objektträger für 10 min in eine 0,075% H₂O₂-Lösung eingebracht, um endogene Peroxidasen zu blockieren. Die Schnitte wurde anschließend durch 5-minütiges Waschen in 1x PBS vom H₂O₂ befreit. Hiernach wurden die Färbefelder mit einem Diamantschliff umrundet und mit je 100 µL der jeweiligen Primär-Antikörperlösung benetzt, welche dann für 60 min bei Raumtemperatur auf den Schnitten verblieb. Sie bestand aus der in Tabelle 7 angegebenen Primär-Antikörper-Konzentration in 10% FKS und 1x PBS. Die nicht gebundenen Antikörper wurden im Anschluss durch zweimaliges, je 5-minütiges Waschen in 1x PBS entfernt. Anschließend wurde der *EnVision™*-Sekundär-Antikörper unverdünnt auf die Färbefelder aufgetragen und inkubierte dort bei Raumtemperatur für 30 min. Hiernach wurden die ungebundenen Zweit-Antikörper zweimal für je 5 min mit 1x PBS von den Schnitten gewaschen.

Tabelle 7 - Verwendete Primär- und Sekundärantikörper für die Immunhistochemie.

Aufgelistet sind die verwendeten Primär- und Sekundär-Antikörper, sowie deren Ursprungsspezies, Bezug und Verdünnung. Zudem ist die der Färbung zugrundeliegende Methode angegeben.

<u>1. Antikörper</u>	Spezies	Verdünnung	<u>2. Antikörper</u>	Spezies	Verdünnung	Methode
Anti-CD3 (Santa-Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Kalifornien, USA)	Ziege <i>anti</i> Maus	1:150	Biotinylated Rabbit Anti-Goat IgG Antibody BA-5000 (Vector Laboratories, Burlingame, Kalifornien, USA)	Kaninchen <i>anti</i> Ziege	1:400	ABC
Anti-CD 11b (BD-Pharmingen, San Diego, Kalifornien, USA)	Ratte <i>anti</i> Maus	1:50	Dako EO 468 (Dako, Glostrop, Dänemark)	Kaninchen <i>anti</i> Ratte	1:200	ABC
Anti-ICAM-1 (Pharmingen, San Diego, Kalifornien, USA)	Hamster <i>anti</i> Maus	1:50	Dianova # 127-035-160 (Dianova, Hamburg, DE)	Ziege <i>anti</i> Hamster	1:100	indirekt
Anti-Kollagen I (Chemicon, Nürnberg, DE)	Kaninchen <i>anti</i> Maus	1:600	EnVision™ (Dako, Glostrop, Dänemark)	-	Unverdünnt	Polymer
Anti-Kollagen III (Calbiochem, Darmstadt, DE)	Kaninchen <i>anti</i> Maus	1:200	EnVison™ (Dako, Glostrop, Dänemark)	-	Unverdünnt	Polymer
Anti-MMP-9 (Chemicon, Nürnberg, DE)	Kaninchen <i>anti</i> Maus	1:200	EnVison™ (Dako, Glostrop, Dänemark)	-	Unverdünnt	Polymer
Anti-Nitrotyrosin (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE)	Kaninchen <i>anti</i> Maus	1:75	EnVision™ (Dako, Glostrop, Dänemark)	-	Unverdünnt	Polymer
Anti-VCAM-1 (BD-Pharmingen, San Diego, Kalifornien, USA)	Ratte <i>anti</i> Maus	1:50	Dako EO 468 (Dako, Glostrop, Dänemark)	Kaninchen <i>anti</i> Ratte	1:200	ABC

2.6.4.2 Enzymatisches Detektionssystem

In der vorliegenden Arbeit wurde die HRP als enzymatisches Detektionssystem verwendet. Es war direkt oder indirekt über einen ABC-Komplex oder ein Dextran-Polymer an den Sekundär-Antikörper gekoppelt (siehe Abbildung 3). Die HRP wandelt das Substrat Wasserstoffperoxid (H_2O_2) in Wasser und Protonen um. Die Protonen oxidieren dann das farblose 3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC), wodurch sich dieses rosenrot färbt.

In der aktuellen Arbeit wurden nach dem Abwaschen ungebundener Sekundär-Antikörper oder ABC-Komplexe die Objektträger für 12 min mit der AEC-Färbelösung, bestehend aus 0,0025% AEC (w/v), 0,05% H_2O_2 (v/v), 20% N,N-Dimethylamid (v/v), 15 mM Essigsäure und 35 mM Natriumacetat, in Dunkelheit inkubiert. Währenddessen färbte sich das farblose AEC rosenrot. Um diese Reaktion zu terminieren, wurden die Gewebsschnitte zweimal für 5 min in 1x PBS gewaschen. Anschließend wurden die Objektträger zur Gegenfärbung von Zellkernen und Zytoplasma kurz in Hämalaun getaucht und mit warmem Leitungswasser gebläut. In den so entwickelten Schnitten waren die Antikörper-markierten Strukturen rosenrot und das übrige Myokard blau angefärbt. Zum Schluss wurden die Objektträger mithilfe von erwärmter Glyceringelatine und Deckgläsern eingedeckt. Um unspezifische Anfärbungen des Hintergrundes durch den Sekundärantikörper oder eine unzureichende H_2O_2 -Blockade auszuschließen, wurden Negativkontrollen durchgeführt.

2.6.5 Auswertung der histo- und immunhistochemischen Färbungen

Die Färbungen wurden mittels eines Mikroskops ohne Kenntnis der Gruppenzugehörigkeit computergestützt ausgewertet. Hierfür wurden 3 Gewebsschnitte mit jeweils mindestens 20 Gesichtsfeldern analysiert. Endokardiale Strukturen und Gefäße wurden von der Auswertung ausgeschlossen. Die Auswertung erfolgte halbautomatisch mit dem Bildverarbeitungsprogramm *Lucia G Version 3.52ab* (Lucia Imaging, Prag, Tschechien). Das Programm erkennt mit Hilfe färbungsspezifischer Makros die spezifisch angefärbten Strukturen und den Hintergrund. Zur Spezifizierung konnten einzelne Bereiche der Gesichtsfelder manuell von der Analyse ausgeschlossen werden. Abhängig vom verwendeten Makro wurde das Verhältnis zwischen angefärbter Fläche, respektive markierten Zellen, zur Herzfläche ermittelt und anschließend deren Mittelwert bestimmt.

Die Sirius Red-Färbung wurde mit dem Rotationspolarisationsmikroskop *Eclipse E 600 Pol* (Nikon, Tokyo, Japan) bei zirkulär polarisiertem Licht ausgewertet. Die Bilder des Mikroskops wurden mit der Videokamera *Sony 3 CCD* (Sony, Tokyo, Japan) und dem Framegrabber *Matrox Comet* (Matrox Imaging, Dorval, Kanada) digitalisiert und auf einen Computer übertragen. Da bei dieser Färbung lediglich das Kollagen unter polarisiertem Licht leuchtete, der Hintergrund aber nicht gegengefärbt werden konnte, musste die Herzfläche manuell eingegrenzt werden. Um eine Verfälschung der Analyse durch perivaskuläres Kollagen zu vermeiden, wurde dieses von der Auswertung ausgeschlossen. Als Resultat wurde das Verhältnis vom Gesamtkollagen zur Herzfläche (mm^2 Gesamtkollagen/ mm^2 Herzfläche) ermittelt.

Die Auswertung der übrigen Färbungen erfolgte mit dem Durchlichtmikroskop *Leica DMRD* (Leica, Bensheim, Deutschland), dessen Bilder mit der Videokamera *Sony 3 CCD* (Sony, Tokyo, Japan) und dem Framegrabber *Matrox Comet* (Matrox Imaging, Dorval, Kanada) auf den Computer übertragen und dann ausgewertet wurden. Bei der CD3-, CD11b- und TUNEL-Färbung wurde die Relation zwischen markierten Zellen und dem Herzgewebe (Anzahl der Zellen/ mm^2 Herzfläche) bestimmt. Für die übrigen Färbungen wurde der Anteil der Fläche der spezifisch angefärbten Struktur am Gesamtgewebes (mm^2 angefärbte Struktur/ mm^2 Herzfläche) ermittelt.

2.7 Statistik

Für die statistische Analyse und graphische Darstellung der Ergebnisse wurde das Statistikprogramm *GraphPad Prism 4* (GraphPad Software Inc., La Jolla, Kalifornien, USA) genutzt. Die Daten wurden als Mittelwert (MW) \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM: *standard error of mean*) ausgewiesen. Die graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgte in Form von Säulendiagrammen, welche die MW und mit den Fehlerbalken die SEM abbilden.

Zur Detektion von Unterschieden zwischen den einzelnen Gruppen wurde zunächst eine einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt. Waren die Vergleichsgruppen verschieden voneinander, wurden sie mit dem *post-hoc*-Test nach Bonferroni auf signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen untersucht. Ab einem Wert von $p < 0,05$ wurden die Unterschiede als statistisch signifikant gewertet und entsprechend gekennzeichnet.

Tabelle 8 - Verwendete Geräte.

Dargestellt sind alle in der vorliegenden Arbeit verwendeten Laborgeräte unter Angabe der Bezeichnung und der Bezugsquelle.

Arbeitsgerät	Bezeichnung	Bezugsquelle
250°C Ofen		Heraeus, Osterode, Deutschland (DE)
Autoklaviergerät		Hartmann & Braun, Frankfurt/Main, DE
Beatmungsgerät	Mini-Vent Typ 55-7066	Harvard Apparatus, Massachusetts, USA
DC Bridge Amplifier Type 660	Brückenverstärker	Hugo Sachs Elektronik, March, DE
Diamantschleifer	Gravier Komplett Set	Proxxon, Föhren, DE
Differentiator Slope Quotient Coupler Type 575		Hugo Sachs Elektronik, March, DE
Eismaschine	AF-10	Scotsman, Vernon Hills, USA
Elektronische Waage	DMS 580	Kern Elektronik, Albstadt, DE
Elektrophoresekammer	Mini-Protean® 3 Cell	Bio-Rad, München, DE
ELISA-Messgerät	Sunrise Absorbance Reader	Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz
Framegrabber	Matrox Comet	Matrox Imaging, Dorval, Kanada
Gellaufkammer		Biometra, Göttingen, DE
Gel-Schlitten		Eigenproduktion Charité, Berlin, DE
Gewebeeinbettungsautomat	Shandon	Frankfurt/Main, DE
Heart Rate Module HRM Type 669		Hugo Sachs Elektronik, March, DE
Homogernisiergerät	Pellet Pestle Moto	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
Kühlschrank -20°C	Economic super	Bosch GmbH, Stuttgart, DE
Kühlschrank 4°C	Cooler	Bosch GmbH, Stuttgart, DE
Kühlschrank -80°C	Nuaire Ultralow Freezer	Zapf Instrumente, Sarstedt, DE
Kühlschrank -80°C	(ISH)	GFL
Kühlzentrifuge +4°C	Megafuge 1.OR	Heraeus, Osterode, DE
Küvetten		VWR Merck, Darmstadt, DE
Lichtmikroskop	DMRB	Leica, Bensheim, DE
Magnetrühr- und Erwärmungsplatte	Ikamag RCT	IKA-Labortechnik, Staufen, DE
Messzylinder		Brand, Wertheim, DE
Mikrokonduktanzkatheter	1.2 French	Millar-Instruments, Houston, Texas, USA
Mikrotom/ Kryostat	Jung CM 3000	Leica, Bensheim, DE
Mikrowelle	Microwave 800	Severin
Multipipette	Multipipette plus	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, DE
ND-1000 Spektr-Photometer		NanoDrop Technologies Inc., Wilmington, Delaware, USA
Netzgerät	Standard Power Pack	Biometra, Göttingen, DE
PCR-Gerät	PCR-Mastercycler gradient	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, DE
pH-Meter	Knick Digital 646	Beyer, Düsseldorf, DE
Pipetten	Reference	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, DE
Polarisationsmikroskop	Eclipse E 600 Pol	Nikon, Tokio, Japan
Polycarbonat-Tierkäfig	Makrolon II, 26,5 x 20,5 x 14,5 cm	Ehret, Emmendingen, Deutschland
Polycarbonat-Tierkäfig	Makrolon III, 42 x 26,5 x 15,5 cm	Ehret, Emmendingen, Deutschland

Präzisionswaage		Sartorius, Göttingen, DE
Real-Time-PCR-Cycler	AbiPrism™ 7900HT Sequence Detection System	Applied Biosystems, Foster City, Kalifornien, USA
Saugvorrichtung für Pipetten	Bibby Rechargeable	VWR Merck, Darmstadt, DE
Schüttler	Swip	Edmund Bühler, Tübingen, DE
Schüttler	3015 (ISH)	GFL
Szintillationsmessgerät	LS 1701Beckman-Coulter	Beckman, Krefeld, DE
Thermomixer	Comfort	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, DE
Tischzentrifuge	Centrifuge 5415 C	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, DE
Transluminator	Bio Doc Analyse System	Biometra, Göttingen, DE
Ultrazentrifuge	Sorval Superspeed RC-2B	Kendro, Langenselbold, DE
Videokamera	Sony 3 CCD	Sony, Tokio, Japan
Vortex-Gerät	VF 2	IKA-Labortechnik, Staufen, DE
Wasserbad	GFL	Burgwedel, DE
WR3101 Mark VII Linearrecorder		Graphtec, Yokohama, Japan
Zentrifuge	Biofuge 13R (ISH)	Heraeus, Osterode, DE

Tabelle 9 - Verwendete Verbrauchsmaterialien.

Dargestellt sind alle in der vorliegenden Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien unter Angabe der Bezeichnung und der Bezugsquelle.

Artikel	Bezeichnung	Bezugsquelle
Deckgläser	21 x 26 mm	Menzel-Gläser, Braunschweig, DE
Eindeckkassetten		Simport, Beloeil, Kanada
Einmalpipetten, steril	5 ml	Falcon, Sarstedt, Nümbrecht, DE
Feintücher	Kim Wipw lite	Hakle-Kimberley, Mainz, DE
Homogenisierstäbe	Pellet Pestles	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
Injektionskanüle	18G und 20G	Braun, Meisungen, DE
Kryotubes	1,5 mL	Greiner, Solingen-Wald, DE
Mikrotiterplatte		Falcon, Sarstedt, Nümbrecht, DE
Objektträger	Super-Frost Plus	Menzel-Gläser, Braunschweig, DE
Pipettenspitzen 10/100/1000 µl	unsteril	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, DE
Reaktionsgefäß 0,2 mL		Biozym, Hess. Oldendorf, DE
Reaktionsgefäß 0,5/1,5 mL	RNAse-frei	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, DE
Reaktionsgefäß 0,5/1,5 mL	Safe-Lock	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, DE
Reaktionsgefäß 15 mL	Falcon tube	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Realtime Platten	MicroAmp	Applied Biosystems, Foster City, Kalifornien, USA
Spritzenvorsatzfilter		Kendro, Langenselbold, DE
Zentrifugationsgefäß	Polypropylen Oak Ridge Bottle	Kendro, Langenselbold, DE

Tabelle 10 - Verwendete Reagenzien.

Dargestellt sind alle in der vorliegenden Arbeit verwendeten Reagenzien unter Angabe der Bezeichnung/Erklärung und der Bezugsquelle.

Reagenzien	Bezeichnung/ Erklärung	Bezug
3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC)		Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
ABC-Kit	Vectarstain Standard	Vector Laboratories, Burlingame, Kalifornien, USA
Aceton	100%	J.T. Backer, Deventer, Niederlande
Agarosepulver	SeaKem LE Agarose	Biozym, Hess. Oldendorf, DE
Altromin 1324 Alleinfutter	Mausfutter	Altromin GmbH, Lage, DE
Aqua bidest.	Ampuwa Spüllösung	Fresenius, Bad Homburg, DE
Avidin-Biotin-Blocking-Kit		Vector Laboratories, Burlingame, Kalifornien, USA
BCA-Protein-Assay-Kit	Proteinkonzentrationsbestimmung	Pierce Biotechnology, Rockford, Illinois, USA
Biotinylated Rabbit Anti-Goat IgG Antibody BA-5000	biotinylierter Zweit-Antikörper (Kaninchen anti-Ziege)	Vector Laboratories, Burlingame, Kalifornien, USA
Bromphenolblau	Zymographie (Lade-Puffer)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
BSA	Bovines Serum Albumin	Vector Laboratories, Burlingame, Kalifornien, USA
CaCl ₂		VWR Merck, Darmstadt, DE
Chloroform		VWR Merck, Darmstadt, DE
Coomassie-Blue H250	Coomassie-Färbelösung (Zymographie)	VWR Merck, Darmstadt, DE
Corbit-Balsam	Eindeckung von Gewebsschnitten	I. Hecht, Kiel, DE
DeadEnd™ Colorimetric TUNEL System	TUNEL-Färbung	Promega, Madison, Wisconsin, USA
Eplerenon	selektiver MR-Antagonist	Pfizer, New York, USA
Essigsäure		VWR Merck, Darmstadt, DE
Ethanol absolut	Dab 9 reinst	VWR Merck, Darmstadt, DE
Fetales Kälber-Serum (FKS)		PAA Laboratories, Pasching, DE
Gelatine	Zymographie	Bio-Rad, München, DE
Gemisch aus Protease- und Phosphatase-Inhibitoren		Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
Glycerin	Zymographie (Lade-Puffer)	Serva, Heidelberg, DE
Glycin	Zymographie (Elektrophoresepuffer)	Serva, Heidelberg, DE
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
Hämalaun-Färbelösung	Gegenfärbung der Gewebsschnitte	VWR Merck, Darmstadt, DE
HCl	Salzsäure 1 M	VWR Merck, Darmstadt, DE
High-Capacity-cDNA-Archive-Kit	Kit zur reversen Transkription von RNA in cDNA	Applied Biosystems, Foster City, Kalifornien, USA
Isopropanol		VWR Merck, Darmstadt, DE

Kaiser's Glyeringelatine	Eindecken der Gewebsschnitte	VWR Merck, Darmstadt, DE
Methanol		J.T.Baker, Deventer, Holland
N,N-Dimethylamid		VWR Merck, Darmstadt, DE
NaCl		VWR Merck, Darmstadt, DE
NaN ₃		VWR Merck, Darmstadt, DE
Natirum-Dodecylsulfat	SDS	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
Natriumacetat		VWR Merck, Darmstadt, DE
Natriumdesoxycholsäure		VWR Merck, Darmstadt, DE
Nonidet P-40		Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
Normalserum	aus Kaninchen	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
Paraplast®	Paraffineinbettungsmedium	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
peqGOLD Protein-Marker V	Zymographie	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, DE
Picosirius Red	Sirius Red-Färbung	Polyscience, Warrington, Pennsylvania, USA
Pikrinsäure	Sirius Red-Färbung	Polyscience, Warrington, Pennsylvania, USA
Polyacrylamid (Precast Ready Gel 10%)	Zymographie	Bio-Rad, München, DE
Poly-L-Lysin		Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
Proteinase K		Roche, Grenzach-Whylen, DE
Protease- und Phosphatase-Inhibitoren	Proteinextraktion	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
RLT-Puffer		Qiagen, Hilden, DE
RNase-free Aqua dest.	RNase-freies destilliertes Wasser	Qiagen, Hilden, DE
RNase-free DNase-Set		Qiagen, Hilden, DE
RNeasy-Kit	RNA-Extraktion	Qiagen, Hilden, DE
RPE-Puffer	Waschpuffer	Qiagen, Hilden, DE
RW1- Waschpuffer	Waschpuffer	Qiagen, Hilden, DE
TaqMan® Universal PCR Master Mix		Applied Biosystems, Foster City, Kalifornien, USA
Thiopental	Sedativum	Glaxo-Smith, London, Großbritannien
Tissue Tec®	Gewebeeinbettungsmedium	Sakura, Tokio, Japan
Tris-HCl	Zymographie (Lade-Puffer)	VWR Merck, Darmstadt, DE
Trishydroxymethylaminomethan	Zymographie (Elektrophoresepuffer)	VWR Merck, Darmstadt, DE
Triton X-100	Detergenz für die Zymographie	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
Trizol®		Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA
Xylol		VWR Merck, Darmstadt, DE
ZnCl		VWR Merck, Darmstadt, DE
β-Mercapto-Ethanol		VWR Merck, Darmstadt, DE

3 Ergebnisse

Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse der zuvor erläuterten Methoden dargestellt.

3.1 Morbidität und Mortalität

Zur Beurteilung des klinischen Verlaufs der Myokarditis wurden in der vorliegenden Arbeit die Morbidität und Mortalität untersucht. Zur Abschätzung der Morbidität wurden Veränderungen des Körpergewichts, des absoluten sowie relativen Herzgewichts und des Flüssigkeitsgehalts der Lungen bestimmt.

Tabelle 11 - Tiercharakteristika.

Die dargestellten Werte wurden durch Wiegen und Relationsberechnung gewonnen. Alle Datensätze sind als Mittelwert (MW) ± Standardfehler des Mittelwertes (SEM) ausgewiesen. # vs. CO 8d und vs. E+ 8d, p < 0,01; + vs. CO 28d und E+ 28d, p < 0,05; \$ vs. CO 8d und vs. E+ 8d, p < 0,01; § vs. CVB+ 8d, p < 0,05.

	8 Tage Therapiedauer				28 Tage Therapiedauer			
	CO 8d (n = 8)	E+ 8d (n = 8)	CVB+ 8d (n = 8)	CVB+/E+ 8d (n = 8)	CO 28d (n = 8)	E+ 28d (n = 8)	CVB+ 28d (n = 8)	CVB+/E+ 28d (n = 8)
Körpergewicht bei Beginn [g]	19,3 ± 0,4	19,6 ± 0,3	20,2 ± 0,2	20,0 ± 0,2	18,6 ± 0,3	18,2 ± 0,2	18,7 ± 0,3	18,1 ± 0,3
Körpergewicht am Ende [g]	20,3 ± 0,5	20,4 ± 0,4	17,5 ± 0,3 #	17,5 ± 0,6 #	19,8 ± 0,2	19,9 ± 0,3	18,2 ± 0,4 +	18,6 ± 0,5
Absolutes Herzgewicht [mg]	75,0 ± 2,1	74,7 ± 2,1	85,7 ± 1,7 \$	74,7 ± 3,2 §	78,7 ± 1,4	77,8 ± 2,4	76,1 ± 2,4	74,0 ± 2,0
Relatives Herzgewicht [g/mg]	3,7 ± 0,1	3,7 ± 0,1	4,9 ± 0,1	4,3 ± 0,3	4,0 ± 0,1	3,9 ± 0,1	4,2 ± 0,1	4,0 ± 0,1
Flüssigkeitsgehalt der Lungen [%]	75,6 ± 0,4	75,0 ± 0,5	77,2 ± 0,8	75,3 ± 0,3	75,6 ± 0,7	76,7 ± 0,3	76,7 ± 0,3	76,1 ± 0,3

Das Körpergewicht der nicht-infizierten Kontrolltiere nahm während des gesamten Experimentes zu. Die CVB3-infizierten Mäuse verloren jedoch in den ersten 8 Tagen *post infectionem* (p.i.) an Körpergewicht und waren 1,2-fach (p < 0,01) leichter als die Kontrolltiere. Eine relevante Beeinflussung durch die Therapie mit dem selektiven MR-Blocker war zu diesem Versuchszeitpunkt nicht auszumachen. 28 Tage p.i. erreichten die mit dem selektiven MR-Antagonisten therapierten, CVB3-infizierten Tiere wieder ihr Ausgangsgewicht. CVB3-infizierte, Plazebo-therapierte Mäuse nahmen signifikant geringer an Gewicht zu. Sie hatten ein 1,1-fach (p < 0,05) geringeres Körpergewicht (siehe Tabelle 11). Bei der Bestimmung des absoluten Herzgewichtes

zeigte sich nach 8-tägiger Versuchsdauer, dass das Herzgewicht der CVB3-infizierten, scheintherapierten Tiere 1,1-fach höher ($p < 0,05$) war als das der CVB3-infizierten, Verum-therapierten Tiere und der nicht-infizierten Tiere. Dies war nach 28-tägiger Versuchsdauer nicht mehr nachweisbar. Das relative Herzgewicht, bei dem das absolute Herzgewicht auf das Körpergewicht am Therapieende bezogen wurde, wurde durch die CVB3-Infektion und die Therapie nicht signifikant beeinflusst. Nach 8-tägiger Versuchsdauer war das relative Herzgewicht der CVB3-infizierten Tiere lediglich tendenziell erhöht (siehe Tabelle 11).

Als Surrogat-Parameter für eine pulmonalvenöse Stauung oder ein Lungenödem wurde der Flüssigkeitsgehalt der Lungen bestimmt. Die CVB3-Infektion, die Therapie mit dem selektiven MR-Blocker und die Therapiedauer beeinflussten diesen jedoch nicht signifikant (siehe Tabelle 11).

Die Untersuchung der Mortalität zeigte, dass während der ersten 8 Versuchstage, bedingt durch die CVB3-Infektion, 5 scheintherapierte und 6 mit dem selektiven MR-Antagonisten behandelte Tiere verstarben. In den folgenden 20 Versuchstagen verstarb ausschließlich eine CVB3-infizierte, scheintherapierte Maus. Eine signifikante Beeinflussung der Mortalität durch die selektive MR-Blockade bestand nicht ($p > 0,05$; siehe Abbildung 4).

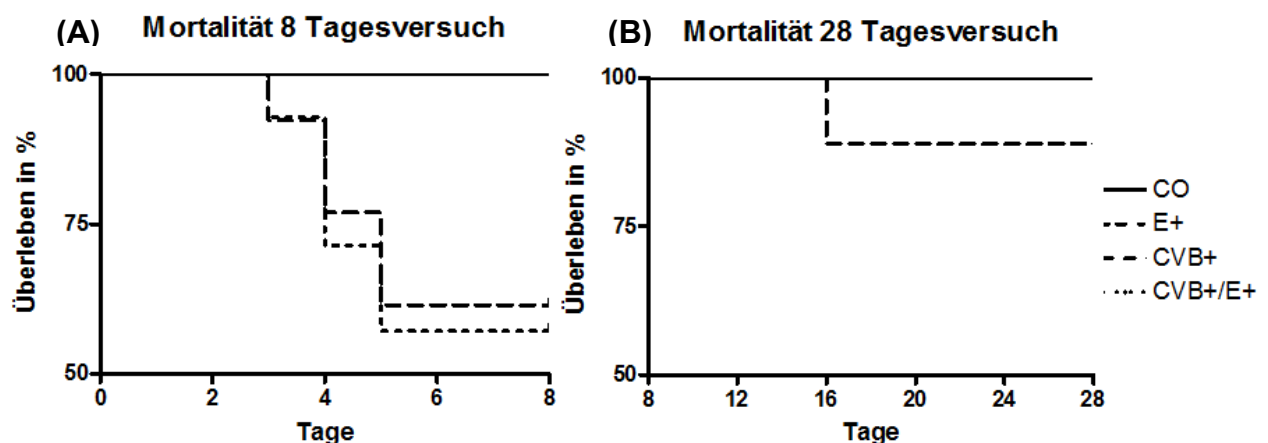


Abbildung 4 - Mortalität.

Darstellung als Kaplan-Meier-Überlebenskurven für den Zeitraum der ersten 8 Tage (A) und den zweiten Zeitraum vom 8.-28. Tag (B). Während der ersten 8 Tage verstarben 5 CVB3-infizierte, scheintherapierte Tiere und 6 CVB3-infizierte, therapierte Tiere ($p > 0,05$). Im Zeitraum zwischen dem 8. und 28. Versuchstag verstarb 1 infiziertes, scheintherapiertes Tier ($p > 0,05$).

3.2 Hämodynamische Funktion

Um die Wirkung des kardiotropen Virus CVB3 und des selektiven MR-Antagonismus auf die kardiale Funktion zu untersuchen, wurden hämodynamische Parameter zur Beurteilung der allgemeinen, systolischen und diastolischen Herzfunktion bestimmt. Die Messungen wurden mit dem Konduktanz-Mikromanometer-System durchgeführt.

Zur Beurteilung der globalen Herzfunktion wurden der systolische Blutdruck, die Herzfrequenz, das enddiastolische und endsystolische Volumen (LVEDV und LVESV) sowie das Schlagvolumen, das Herzzeitvolumen und die linksventrikuläre Ejektionsfraktion bestimmt. Hierbei zeigte sich, dass sowohl der systolische Blutdruck als auch die Herzfrequenz der verschiedenen Untersuchungsgruppen und -zeitpunkte sich nicht signifikant unterschieden. Zu beiden Versuchszeitpunkten waren der systolische Blutdruck und die Herzfrequenz der CVB3-infizierten Tiere jedoch tendenziell geringer. Beim Vergleich der CVB3-infizierten Versuchsgruppen waren der systolische Blutdruck und die Herzfrequenz der mit dem selektiven MR-Antagonisten behandelten Mäuse höher als bei den Plazebo-therapierten Tieren, erreichten jedoch nicht das Signifikanzniveau (siehe Tabelle 12). Für das LVEDV und LVESV waren signifikante Veränderungen in den CVB3-infizierten Gruppen nachweisbar. Das LVEDV war am 8. Tag p.i. im Vergleich zu den Kontrollgruppen 1,2-fach ($p < 0,05$) bzw. am 28. Tag p.i. 1,3-fach ($p < 0,01$) erhöht. Das LVESV war 8 Tage nach der Infektion im Vergleich zu den Kontrollgruppen 1,6-fach ($p < 0,01$) und 28 Tage nach der Infektion 1,9-fach ($p < 0,01$) erhöht.

Wurden die CVB3-infizierten Tieren mit dem selektiven MR-Antagonisten therapiert, fielen die Zunahme des LVEDV nach 8 wie 28-tägiger Therapiedauer 1,2-fach ($p < 0,01$) geringer und des LVESV nach 8 Versuchstagen 2,3-fach ($p < 0,01$) sowie nach 28 Versuchstagen 1,9-fach ($p < 0,01$) geringer aus. Sie unterschieden sich dann nicht von den Kontrollgruppen (siehe Tabelle 12).

Die Berechnung des Schlagvolumens als Differenz aus LVEDV und LVESV ergab nach 8 Versuchstagen keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Untergruppen. Nach einer Infektionsdauer von 28 Tagen konnte bei den CVB3-infizierten Mäusen im Vergleich zu den Kontrollgruppen ein 1,7-fach geringeres Schlagvolumen ($p < 0,05$) festgestellt werden.

Die mit dem selektiven MR-Blocker behandelten CVB3-infizierten Mäuse wiesen jedoch ein 1,7-fach höheres Schlagvolumen als die scheintherapierten, CVB3-infizierten Tiere

auf ($p < 0,01$). Hierdurch entsprach das Schlagvolumen dem Niveau der Kontrolltiere (siehe Tabelle 12).

Das Herzzeitvolumen und die linksventrikuläre Ejektionsfraktion der CVB3-infizierten Mäuse waren im Vergleich zu den Kontrollgruppen 8 Tage nach Versuchsbeginn jeweils um das 1,6-fache ($p < 0,05$) und am 28. Versuchstag um das 1,8-fache ($p < 0,05$) bzw. 2,1-fache ($p < 0,01$) verringert.

Ein signifikanter Einfluss durch die Therapie mit dem selektiven MR-Antagonisten auf die CVB3-infizierten Tiere war lediglich nach 28-tägiger Versuchsdauer nachweisbar. Hier lagen das Herzzeitvolumen und die linksventrikuläre Ejektionsfraktion 1,9-fach ($p < 0,05$) bzw. 2,2-fach höher als bei den Plazebo-therapierten, CVB3-inizierten Mäusen und entsprachen den Werten der Kontrollgruppen ($p < 0,01$; siehe Tabelle 12).

Ähnliche Veränderungen zeigten sich auch bei der systolischen Herzfunktion. Hierfür wurden der linksventrikuläre endsystolische Druck und die maximale linksventrikuläre Druckanstiegsgeschwindigkeit ermittelt. Im Vergleich mit den Kontrollgruppen wiesen die CVB3-infizierten Tiere 8 Tage nach der Infektion eine 1,6-fache Verringerung des endsystolischen linksventrikulären Drucks ($p < 0,01$) und eine 2,1-fache ($p < 0,01$) Reduktion der maximalen linksventrikulären Druckanstiegsgeschwindigkeit auf.

Die mit dem selektiven MR-Blocker behandelten CVB3-infizierten Mäusen zeigten im Vergleich zu den scheintherapierten CVB3-infizierten Mäusen lediglich für die maximale linksventrikuläre Druckanstiegsgeschwindigkeit eine signifikante Veränderung, nämlich einen Anstieg um das 1,7-fache ($p < 0,05$).

Nach 28-tägiger Versuchsdauer konnte bei den CVB3-infizierten Tieren im Vergleich zu den Kontrollgruppen weiterhin eine 1,5-fache Abnahme des linksventrikulären endsystolischen Drucks ($p < 0,05$) und eine 1,8-fache Verringerung der maximalen linksventrikulären Druckanstiegsgeschwindigkeit ($p < 0,01$) nachgewiesen werden.

CVB3-infizierte Mäuse, die mit dem selektiven MR-Antagonisten therapiert wurden, wiesen im Vergleich zu den Plazebo-therapierten, CVB3-infizierten Tieren einen 1,6-fach höheren linksventrikulären endsystolischen Druck ($p < 0,05$) und eine 1,6-fach ($p < 0,05$) höhere maximale linksventrikuläre Druckanstiegsgeschwindigkeit auf. Hierbei lagen diese Parameter in etwa auf dem Niveau der Kontrollgruppen (siehe Tabelle 12).

Tabelle 12 - Hämodynamische Parameter.

Dargestellt sind die *in vivo* mittels Mikrokonduktanzkatheter in Form von Druck/Volumen-Kurven nach 8 und 28 Versuchstagen gemessenen Werte: SAP: systolischer arterieller Blutdruck, HF: Herzfrequenz, LVEDV: linksventrikuläres enddiastolisches Volumen, LVESV: linksventrikuläres endsystolisches Volumen, SV: linksventrikuläres Schlagvolumen, HZV: Herzzeitvolumen, LVEF: linksventrikuläre Ejektionsfraktion, LVP: linksventrikulärer systolischer Druck, dP/dt_{max} : maximale linksventrikuläre Druckanstiegsgeschwindigkeit, LVEDD: linksventrikulärer enddiastolischer Druck, dP/dt_{min} : maximale linksventrikuläre Druckabfallsgeschwindigkeit; Alle Datensätze sind als Mittelwert (MW) \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) ausgewiesen. # vs. CO 8d, $p < 0,01$ und vs. E+ 8d, $p < 0,05$; * vs. CVB+ 8d, $p < 0,01$; + vs. CO 28d und vs. E+ 28d, $p < 0,01$; ° vs. CVB+ 28d, $p < 0,01$; \$ vs. CO 8d und vs. E+ 8d, $p < 0,01$; § vs. CO 28d und vs. E+ 28d, $p < 0,05$; ^ vs. CO 8d und vs. E+ 8d, $p < 0,05$; / vs. CVB+ 28d, $p < 0,05$; ~ vs. CO 8d, $p < 0,05$; ! vs. CO 8d, $p < 0,01$; % vs. CVB+ 8d, $p < 0,05$; & vs. CO 28d, $p < 0,01$ und vs. E+ 28d, $p < 0,05$.

	8 Tage Therapiedauer				28 Tage Therapiedauer			
	CO 8d (n = 5)	E+ 8d (n = 5)	CVB+ 8d (n = 7)	CVB+/E+ 8d (n = 6)	CO 28d (n = 8)	E+ 28d (n = 8)	CVB+ 28d (n = 8)	CVB+/E+ 28d (n = 8)
<u>Globale Herzfunktion:</u>								
SAP [mm Hgg.]	78,6 \pm 6,4	81,7 \pm 5,4	62,2 \pm 4,9	75,7 \pm 5,0	73,55 \pm 5,1	75,6 \pm 7,3	55,2 \pm 6,1	71,1 \pm 4,3
HF [1/min]	367,7 \pm 26,3	409,3 \pm 15,2	291,4 \pm 26,1	348,7 \pm 20,7	422,8 \pm 24,4	429,5 \pm 26,8	382,9 \pm 30,4	415,8 \pm 32,6
LVEDV [μ L]	51,7 \pm 3,1	53,5 \pm 1,8	62,7 \pm 1,7 #	50,9 \pm 1,7 *	49,7 \pm 2,2	50,7 \pm 1,8	63,2 \pm 1,4 +	50,6 \pm 1,2 °
LVESV [μ L]	27,7 \pm 1,3	30,2 \pm 2,5	45,1 \pm 2,4 \$	31,8 \pm 3,6 *	26,0 \pm 2,8	27,5 \pm 2,6	48,9 \pm 1,4 +	25,9 \pm 1,9 °
SV [μ L]	24,0 \pm 3,1	23,3 \pm 1,1	17,6 \pm 1,3	19,2 \pm 2,2	23,7 \pm 2,9	23,2 \pm 1,9	14,3 \pm 1,3 §	24,8 \pm 1,8 °
HZV [mL/min]	8,7 \pm 1,0	9,4 \pm 0,3	5,3 \pm 0,8 ^	6,7 \pm 1,0	9,7 \pm 1,0	10,0 \pm 1,1	5,4 \pm 0,5 §	10,3 \pm 1,3 /
LVEF [%]	45,9 \pm 3,6	43,8 \pm 3,0	28,2 \pm 2,3 ~	38,3 \pm 5,5	47,5 \pm 4,9	46,3 \pm 4,1	22,6 \pm 1,4 +	48,7 \pm 3,1 °
<u>Systolische Herzfunktion:</u>								
LVP [mm Hg]	85,3 \pm 6,5	77,2 \pm 4,7	53,1 \pm 5,7 #	67,4 \pm 5,4	66,6 \pm 4,4	69,6 \pm 7,8	44,1 \pm 3,6 §	69,6 \pm 4,2 /
dP/dt_{max} [mm Hg/s]	6360 \pm 612	4569 \pm 572	3062 \pm 471 !	5096 \pm 430 %	5616 \pm 463	5289 \pm 698	3184 \pm 383 &	5222 \pm 353 /
<u>Diastolische Herzfunktion:</u>								
LVEDD [mm Hg]	4,3 \pm 1,7	3,2 \pm 0,8	6,0 \pm 0,8	6,4 \pm 1,6	2,2 \pm 0,9	1,4 \pm 0,6	6,3 \pm 2,1	1,6 \pm 0,9
dP/dt_{min} [mm Hg/s]	-3433 \pm 281	-2976 \pm 440	-2066 \pm 260 ~	-2966 \pm 236	-3524 \pm 477	-3572 \pm 529	-1699 \pm 155 §	-3449 \pm 425 /

Zur Überprüfung der diastolischen Herzfunktion wurden der linksventrikuläre enddiastolische Druck und die maximale linksventrikuläre Druckabfallsgeschwindigkeit bestimmt. Die Messung des linksventrikulären enddiastolischen Druckes ergab weder nach 8- noch 28-tägiger Therapiedauer einen signifikanten Unterschied zwischen den Kontrollgruppen und den CVB3-infizierten Untergruppen. Für die maximale linksventrikuläre Druckabfallsgeschwindigkeit als Parameter für die diastolische Relaxation konnte bei den CVB3-infizierten Tieren im Vergleich zu den Kontrollgruppen nach 8 bzw. 28 Tagen p.i. eine 1,7-fache ($p < 0,05$) bzw. 2,1-fache ($p < 0,05$) Abnahme festgestellt werden.

Die CVB3-infizierten, mit dem selektiven MR-Blocker behandelten Mäuse wiesen im Vergleich zu den scheintherapierten, CVB3-infizierten Tieren nach 28-tägiger Versuchsdauer eine 2,0-fache Zunahme ($p < 0,05$) der maximalen linksventrikulären Druckabfallsgeschwindigkeit auf, die 8 Tage nach der CVB3-Infektion noch nicht vorlag (siehe Tabelle 12).

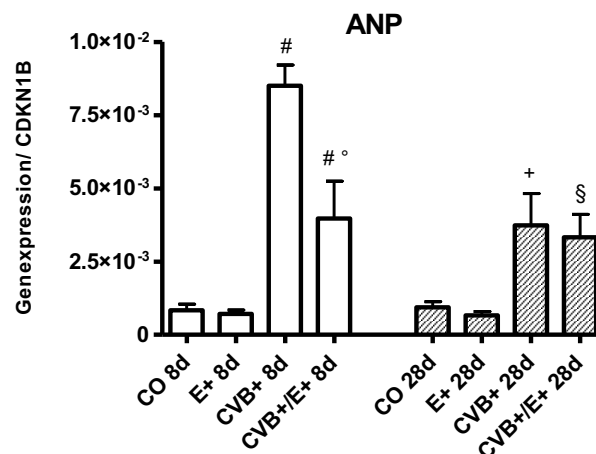


Abbildung 5 - mRNA-Expression von ANP.

Dargestellt ist die mRNA-Expression des ANP (atriales natriuretisches Peptid) nach 8 und 28 Versuchstagen. Die Werte wurden mittels RT-qPCR ermittelt und auf die Expression von CDKN 1B (Cyclin-abhängige-Kinase-Inhibitor 1B) bezogen. Die Versuchsgruppen CVB+ 8d und CVB+ 28d umfassten jeweils $n = 7$ und die übrigen Versuchsgruppen umfassten jeweils $n = 8$ Tiere. Die Werte sind als Mittelwert (MW) \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) ausgewiesen. # vs. CO 8d und E+ 8d, $p < 0,01$; ° vs. CVB+ 8d, $p < 0,01$; + vs. CO 28d, $p < 0,05$ und vs. E+ 28d, $p < 0,01$; § vs. E+ 28d, $p < 0,05$.

Das atriale natriuretische Peptid (ANP) wird bei erhöhtem Druck und Dehnung der Vorhofwand gebildet und ist ein Surrogatparameter für das Vorliegen einer Herzinsuffizienz. Die mRNA-Expression wurde mittels RT-qPCR ermittelt und ist in Abbildung 5 dargestellt.

Bei den CVB3-infizierten Tieren zeigte sich sowohl nach 8 als auch 28 Versuchstagen ein 10,1-facher ($p < 0,01$) bzw. 4-facher ($p < 0,05$) Anstieg der ANP-mRNA-Expression. Wurden die CVB3-infizierten Mäuse mit dem selektiven MR-Antagonisten therapiert, war die ANP-Expression im Vergleich zu den Placebo-behandelten Tieren am 8. Tag p.i. 2,1-fach ($p < 0,01$) und am 28. Tag p.i. 1,1-fach ($p < 0,05$) geringer ausgeprägt.

3.3 Histologische und molekularbiologische Veränderungen des Myokards

Zur Ergründung der bei den hämodynamischen Messungen gefundenen Unterschiede erfolgte eine histologische und molekularbiologische Untersuchung. Hierbei wurden die Entzündungsreaktion, die Apoptose und das Remodeling der EZM untersucht.

3.3.1 Myokardiales Entzündungsgeschehen

Als möglicher Induktor des Remodelings und der myokardialen Apoptose werden Entzündungsprozesse angenommen.

3.3.1.1 Myokardiale Expression von Zytokinen

Um die Auswirkung des selektiven MR-Antagonismus auf das myokardiale Entzündungsgeschehen besser zu verstehen, wurde die mRNA-Expression wichtiger Zytokine, die an der Pathogenese der viralen Myokarditis beteiligt sind, mittels RT-qPCR analysiert. Hierfür wurde die mRNA-Expression von TNF- α , TGF- β , IL-6 und IL-10 ermittelt. Nach 8-tägiger Versuchsdauer war bei den CVB3-infizierten Tieren die Expression von TNF- α 15,7-fach ($p < 0,01$), TGF- β 3,7-fach ($p < 0,01$), IL-6 9,2-fach ($p < 0,01$) und IL-10 118-fach ($p < 0,01$) erhöht.

Die mit einem selektiven MR-Blocker behandelten, CVB3-infizierten Mäuse zeigten im Vergleich zu den Placebo-therapierten, CVB3-infizierten Tieren keine signifikanten Zytokinexpressionsveränderungen. Die Expressionen von TNF- α und TGF- β waren jedoch tendenziell geringer als bei den CVB3-infizierten, scheinbehandelten Mäusen. Nach einer Versuchsdauer von 28 Tagen waren kaum mehr Unterschiede bei der mRNA-Expression der untersuchten Zytokine feststellbar (siehe Abbildung 6).

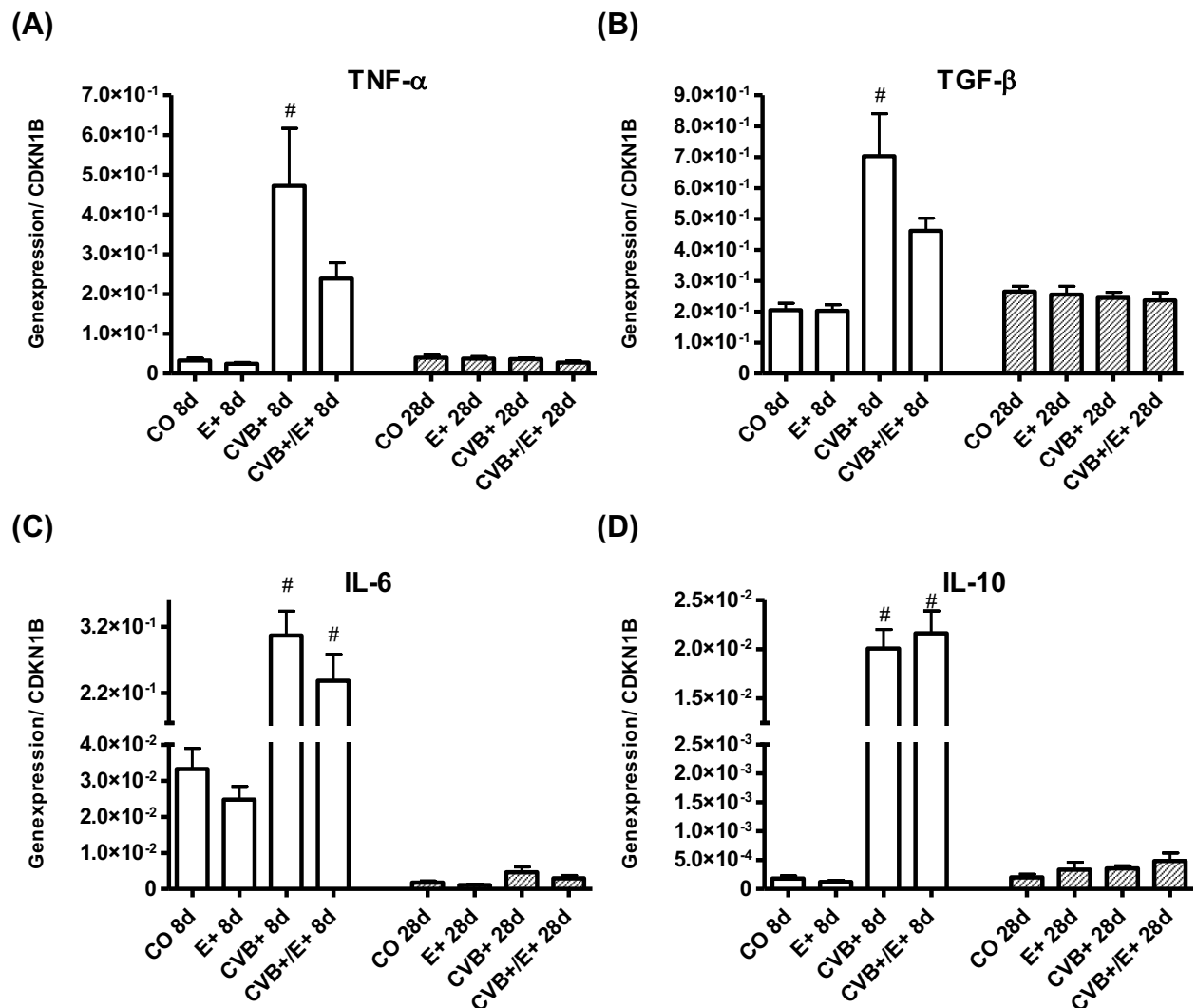


Abbildung 6 - mRNA-Expression kardialer Zytokine.

Dargestellt ist die myokardiale mRNA-Expression der maßgeblich an der Entzündungsreaktion beteiligten pro- und anti-inflammatorischen Zytokine: TNF- α : Tumor-Nekrose-Faktor- α (A), TGF- β : *transforming-growth-factor- β* (B), IL-6: Interleukin-6 (C) und IL-10: Interleukin-10 (D) nach 8 und 28 Versuchstagen. Die Werte wurden mittels RT-qPCR ermittelt und auf die Expression von CDKN 1B (Cyclin-abhängige-Kinase-Inhibitor 1B) bezogen. Die Versuchsgruppen CVB+ 8d und CVB+ 28d umfassten jeweils n = 7 und die übrigen Versuchsgruppen umfassten jeweils n = 8 Tiere. Die Werte sind als Mittelwert (MW) \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) ausgewiesen. # vs. CO 8d und E+ 8d, p < 0,01.

3.3.1.2 Expression von Zelladhäsionsmolekülen

Für die Infiltration von Leukozyten sind verschiedene Oberflächenstrukturen auf Zellmembranen, Adhäsionsmoleküle genannt, von Bedeutung. Daher wurde in dieser Arbeit die Expression von ICAM-1 und des VCAM-1 im myokardialen Gewebe mittels immunhistochemischer Färbungen kryokonservierter Gewebsschnitte untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 7 und Abbildung 8 dargestellt. Die CVB3-Infektion zog 8 bzw. 28 Tage p.i. einen Anstieg der myokardialen Expression von ICAM-1 um das 20-fache (p < 0,01) bzw. 3,0-fache (p < 0,01) nach sich.

Die Therapie dieser CVB3-infizierten Mäuse mit dem selektiven MR-Antagonisten hatte nach 8 bzw. 28 Therapietagen eine 1,8-fache ($p < 0,05$) bzw. 2,0-fache geringere ICAM-1-Expression zur Folge.

Die VCAM-1-Expression war bei den CVB3-infizierten Mäusen 8 Tage p.i. 16,2-fach erhöht ($p < 0,01$). 28 Tage nach der Infektion war dieser Unterschied nicht mehr signifikant.

Die Behandlung der CVB3-infizierten Tiere mit einem selektiven MR-Blocker beeinflusste die VCAM-1-Expression nicht.

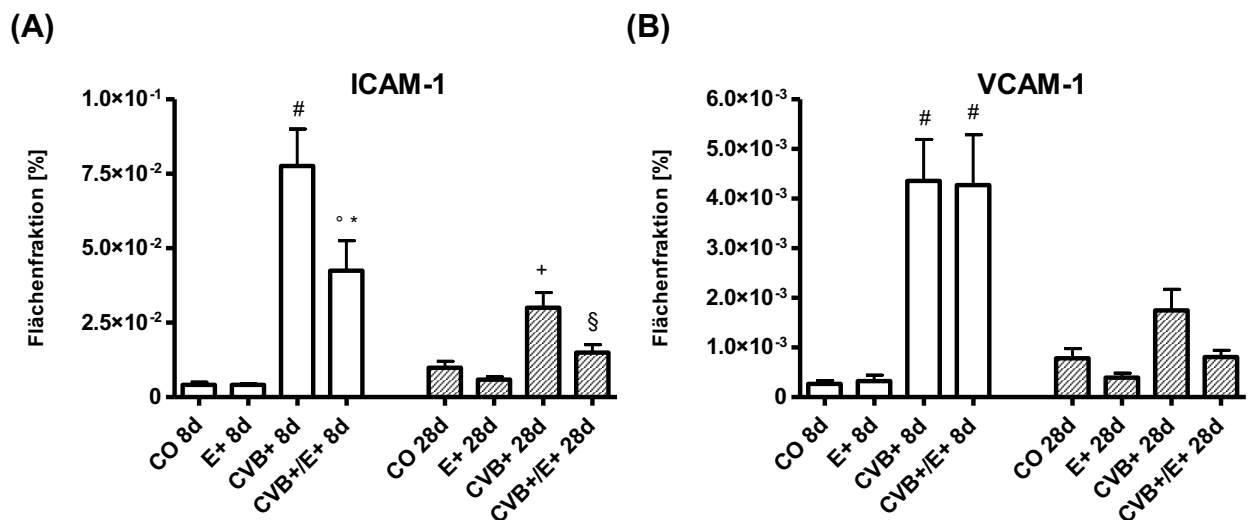


Abbildung 7 - Proteinexpression von ICAM-1 und VCAM-1 (immunhistochemische Färbung).

Dargestellt ist das Ergebnis der Proteinexpressionsanalyse im myokardialen Gewebe von ICAM-1 (A) und VCAM-1 (B) nach 8 und 28 Versuchstagen. Diese wurde mithilfe einer farbcodierten Bildanalyse von immunhistochemischer Färbungen durchgeführt. Jede Versuchsgruppe umfasste $n = 8$ Tiere und pro Tier wurden 3 Gewebsschnitte mit je 20 Gesichtsfeldern analysiert. Alle Datensätze sind als Mittelwert (MW) \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) ausgewiesen. # vs. CO 8d und E+ 8d, $p < 0,01$; * vs. CO 8d und vs. E+ 8d, $p < 0,05$; ° vs. CVB+ 8d, $p < 0,05$; + vs. CO 28d und vs. E+ 28d, $p < 0,01$; § vs. CVB+ 28d, $p < 0,05$.

3.3.1.3 Infiltration von Leukozyten

Mit Hilfe immunhistochemischer Färbungen wurde das kardiale Immunzellinfiltrat untersucht. Hierbei wurden verschiedene Oberflächenmarker zur Differenzierung genutzt. Die T-Lymphozyten wurden durch Anfärben von CD3, einer Komponente des T-Zell-Rezeptors, identifiziert. Myeloide Immunzellen wie Makrophagen, neutrophile Granulozyten und NK-Zellen wurden durch den Nachweis des Markers CD11b, dem Oberflächenprotein Integrin α -M, demaskiert.

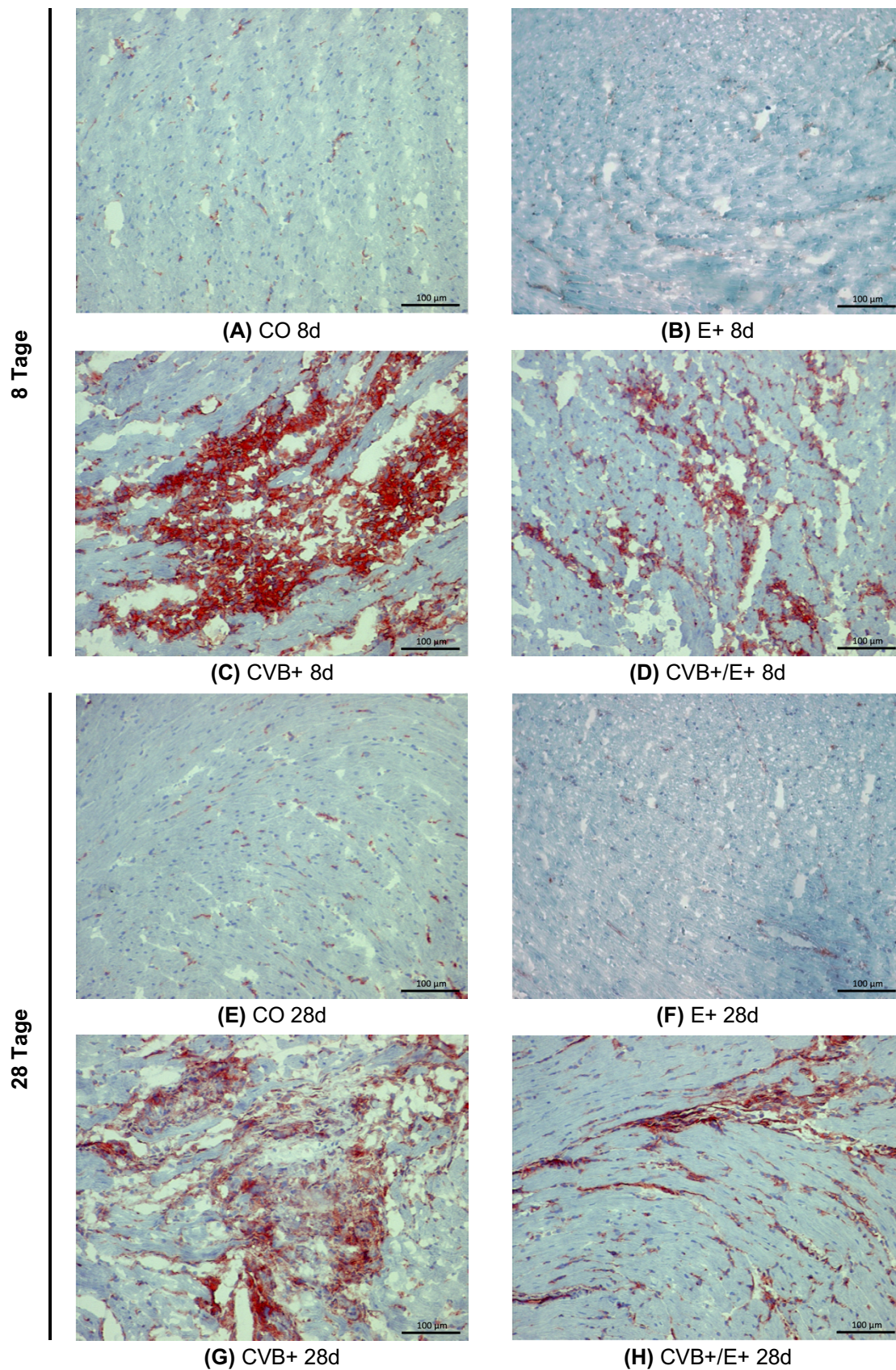


Abbildung 8 - Färbung ICAM-1.

Repräsentative immunhistologische Bilder der Anfärbung für ICAM-1 im linksventrikulären Gewebe nach 8 (A-D) und 28 Versuchstagen (E-H) bei einer 200-fachen lichtmikroskopischen Vergrößerung. Die ICAM-1-spezifischen Epitope sind rot angefärbt.

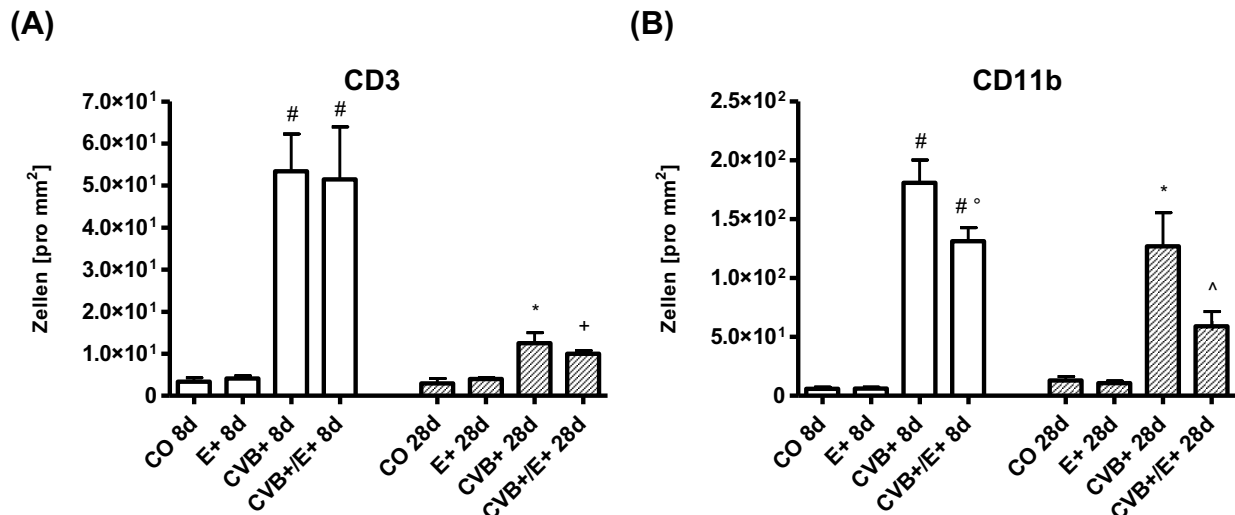


Abbildung 9 - Infiltration von CD3- und CD11b-positiven Zellen (immunhistochemische Färbung). Dargestellt ist die myokardiale Infiltration von CD3-positiven (A) und CD11b-positiven Zellen (B) nach 8 und 28 Versuchstagen. Deren Ermittlung wurde mithilfe einer farbcodierten Bildanalyse von immunhistochemischen Färbungen durchgeführt. Jede Versuchsgruppe umfasste n = 8 Tiere und pro Tier wurden 3 Gewebsschnitte mit je 20 Gesichtsfeldern analysiert. Alle Datensätze sind als Mittelwert (MW) ± Standardfehler des Mittelwertes (SEM) ausgewiesen. # vs. CO 8d und E+ 8d, p < 0,01; * vs. CO 28d und E+ 28d, p < 0,01; + vs. CO 28d und vs. E+ 28d, p < 0,05; ° vs. CVB+ 8d, p < 0,05; ^ vs. CVB+ 28d, p < 0,05.

Bedingt durch die Infektion mit CVB3, wie Abbildung 9 und Abbildung 10 entnommen werden kann, waren sowohl 8 als auch 28 Tage p.i. deutlich mehr CD3-positive und CD11b-positive Immunzellen ins Myokard eingewandert. Dabei überstieg die Zahl der myeloiden Immunzellen die der T-Zellen deutlich. Das Immunzellinfiltrat war am 28. postinfektiösen Tag zudem geringer als 8 Tage nach der CVB3-Infektion. Im Vergleich zu den Kontrollgruppen waren nach 8-tägiger Versuchsdauer 15,8-mal mehr CD3-positive (p < 0,01) und 30,7-mal mehr CD11b-positive Immunzellen (p < 0,01) im Myokard nachweisbar. Am 28. Versuchstag ließ sich im Vergleich zu den Kontrolltieren das 4,2-fache an CD3-positiven (p < 0,01) und das 9,8-fache an CD11b-positiven Zellen (p < 0,01) ermitteln.

Die Therapie der CVB3-infizierten Tiere mit dem selektiven MR-Antagonisten beeinflusste nur die Infiltration der CD11b-positiven Zellen signifikant. Deren Einwanderung war nämlich nach 8 Versuchstagen 2,1-fach (p < 0,05) und 28 Versuchstagen 2,1-fach (p < 0,05) geringer als bei den scheintherapierten, CVB3-infizierten Individuen.

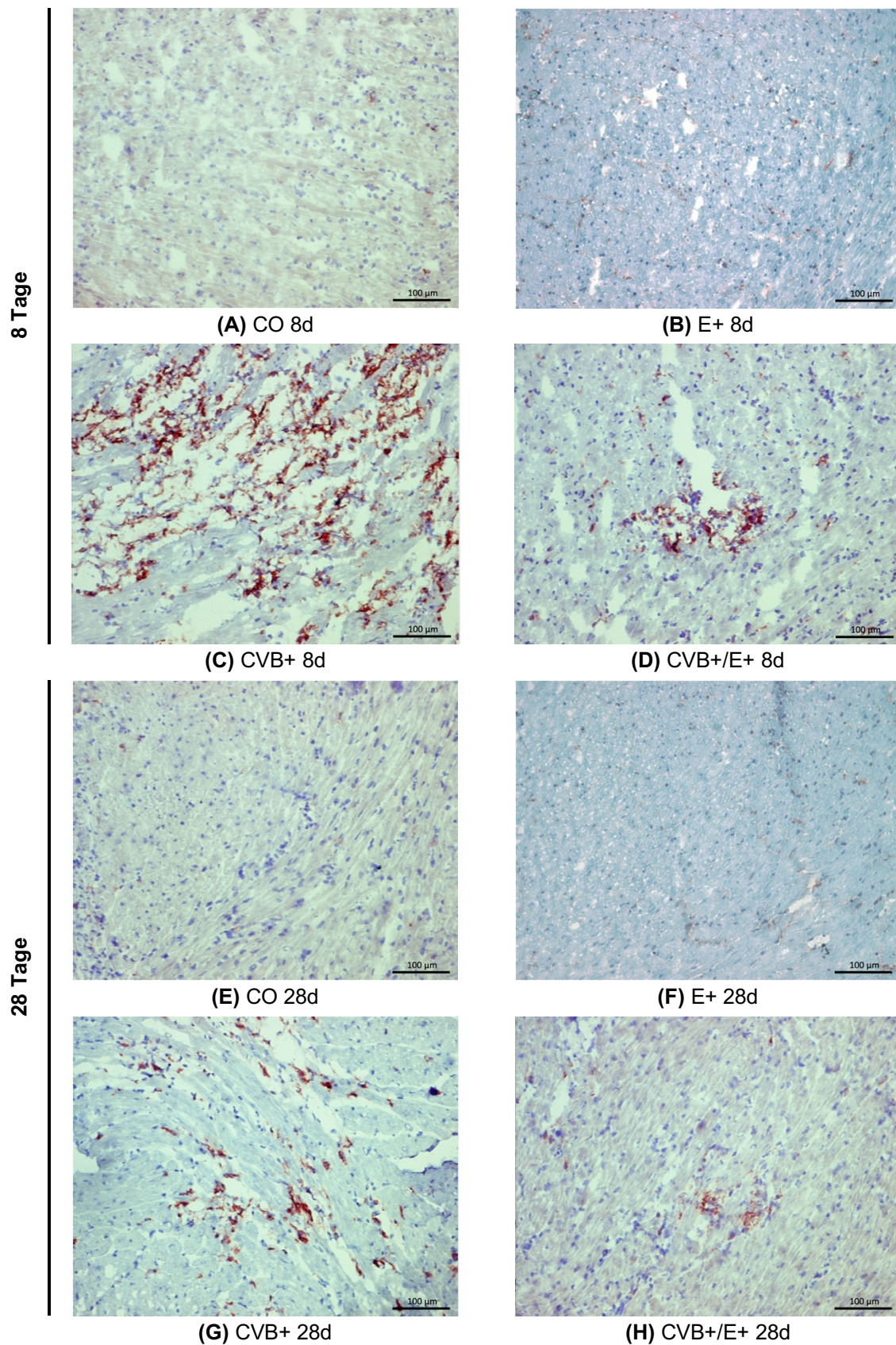


Abbildung 10 - Färbung CD11b-positiver Zellen.

Repräsentative immunhistologische Bilder der Färbung des Oberflächenmarkers CD11b im linksventrikulären Gewebe nach 8 (A-D) und 28 Versuchstagen (E-H) bei einer 200-fachen lichtmikroskopischen Vergrößerung. Die CD11b-spezifischen Epitope sind rot angefärbt.

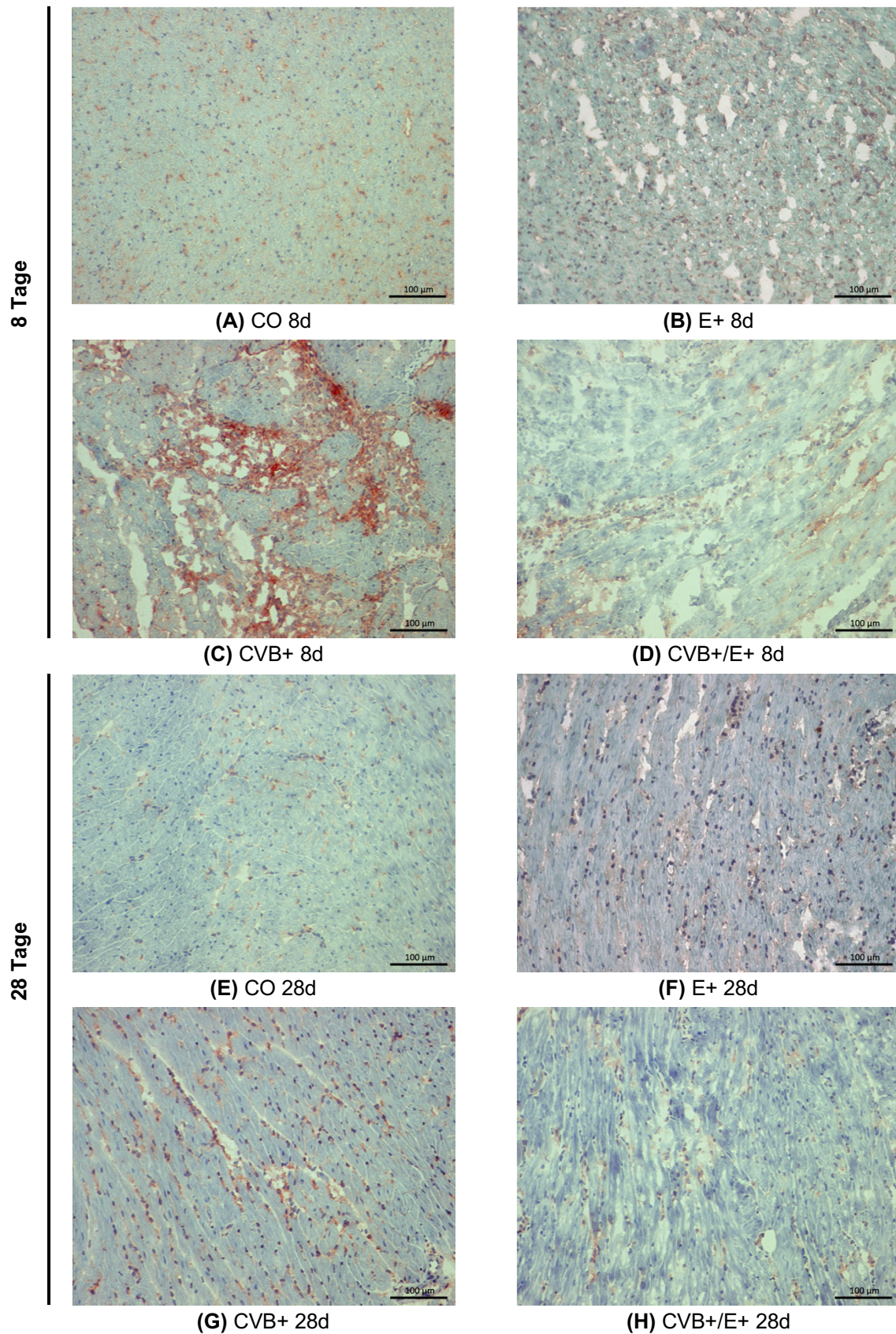


Abbildung 11 - Färbung Nitrotyrosin.

Repräsentative immunhistologische Bilder der Färbung für Nitrotyrosin im linksventrikulären Gewebe nach 8 (A-D) und 28 Versuchstagen (E-H) bei einer 200-fachen lichtmikroskopischen Vergrößerung. Die Nitrotyrosin-spezifischen Epitope sind rot angefärbt.

3.3.1.4 Bildung reaktiver Stickstoffspezies

Eine Folge der Infiltration und Aktivierung der Entzündungszellen, insbesondere von Makrophagen, ist die Freisetzung von reaktiven Stickstoffspezies zur Abwehr des inflammatorischen Stimulus, Regulation der Entzündungsreaktion und Induktion von Apoptose. Unter der Einwirkung dieses nitrosaktiven Stresses kommt es zur Bildung von Nitrotyrosin, welches in der vorliegenden Arbeit durch immunhistochemische Färbung von Gefrierschnitten untersucht wurde. Wie Abbildung 11 und Abbildung 12 zu entnehmen ist, konnte bei den CVB3-infizierten Tieren 8 Tage p.i. eine 3,1-fache Zunahme ($p < 0,01$) der Nitrotyrosin-Bildung nachgewiesen werden.

Die Behandlung der CVB3-infizierten Mäuse mit dem selektiven MR-Blocker unterband diese vermehrte Nitrotyrosin-Bildung. Sie war im Vergleich zu den Plazebo-therapierten Tieren 3,1-fach geringer ($p < 0,01$) und entsprach somit dem Niveau der Kontrollgruppen. Am 28. Versuchstag konnten keine Unterschiede ausgemacht werden.

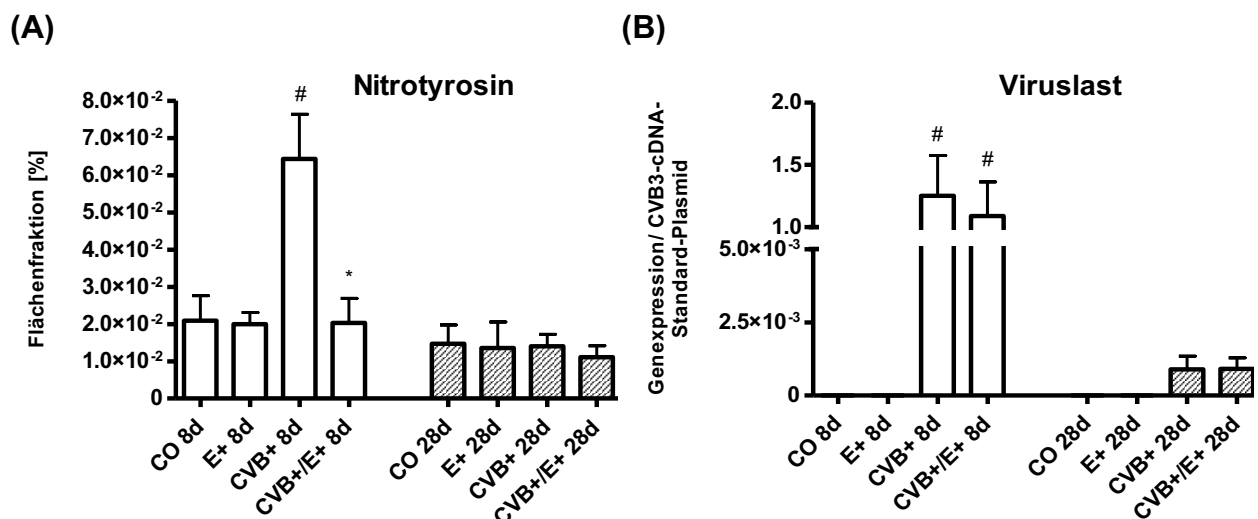


Abbildung 12 - Proteinexpression von Nitrotyrosin und CVB3-Viruslast.

Dargestellt sind nach 8 und 28 Versuchstagen der Nitrotyrosin-Gehalt (A), der mithilfe einer farbcodierten Bildanalyse von immunhistochemischen Färbungen bestimmt wurde und bei dem pro Tier 3 Gewebsschnitte mit je 20 Gesichtsfeldern analysiert wurden, und die Viruslast (B), die mittels RT-qPCR ermittelt und auf die Expression des CVB3-cDNA-Standard-Plasmids bezogen wurde. Alle Versuchsgruppen umfassten jeweils $n = 8$ Tiere. Alle Datensätze sind als Mittelwert (MW) \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) ausgewiesen. # vs. CO 8d und vs. E+ 8d, $p < 0,01$; * vs. CVB+ 8d, $p < 0,01$.

3.3.1.5 CVB3-Virusreplikation

Da das Ausmaß der myokardialen Destruktion und Inflammation durch die kardiale Viruslast beeinflusst wird, wurde diese in der vorliegenden Arbeit untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 12 dargestellt. Die Virus-RNA ließ sich im Myokard aller CVB3-infizierter Mäuse bis zum 28. Versuchstag nachweisen. Mit zunehmender Dauer der CVB3-Infektion nahm die myokardiale Viruslast jedoch deutlich ab.

Hinweise für eine Beeinflussung durch die Therapie mit dem selektiven MR-Antagonisten waren nicht feststellbar. Im Myokard der Kontrolltiere konnte keine Virus-RNA detektiert werden.

3.3.2 Myokardiale Apoptoserate

Um zu untersuchen, in welchem Maße apoptische Prozesse an Veränderung des Myokards beteiligt waren, wurde diese mit einer TUNEL-Färbung quantifiziert. Deren Ergebnis ist in Abbildung 13 dargestellt. Unter dem Einfluss der CVB3-Infektion war im Vergleich zu den Kontrolltieren nach 8 bzw. 28-tägiger Infektionsdauer eine 58,8-fach ($p < 0,01$) bzw. 3,6-fach ($p < 0,01$) höhere Apoptoserate detektierbar.

Wurden die CVB3-infizierten Mäuse mit dem selektiven MR-Blocker behandelt, reduzierte sich diese Rate im Vergleich zu den Plazebo-therapierten Tieren nach 8-tägiger Versuchsdauer um das 2,1-fache ($p < 0,01$). Nach 28 Versuchstagen war dieser Therapieeffekt jedoch nicht mehr nachweisbar.

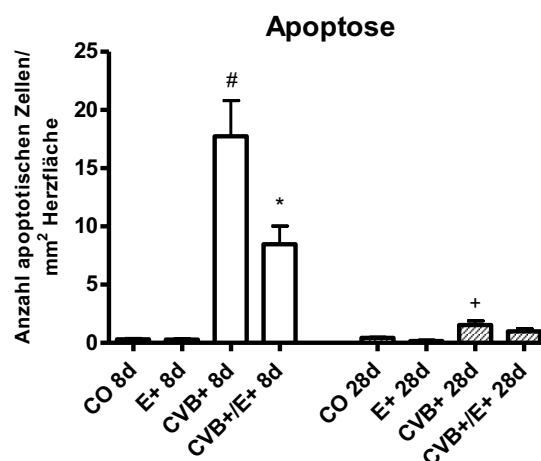


Abbildung 13 - Myokardiale Apoptoserate (TUNEL-Färbung).

Dargestellt ist die durch TUNEL-Färbung bestimmte myokardiale Apoptose nach 8 und 28 Versuchstagen. Deren Ermittlung wurde mithilfe einer farbcodierten Bildanalyse von immunhistochemischen Färbungen durchgeführt. Jede Versuchsgruppe umfasste $n = 8$ Tiere. Pro Tier wurden 3 Gewebsschnitte mit je 20 Gesichtsfeldern analysiert. Alle Datensätze sind als Mittelwert (MW) \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) ausgewiesen. # vs. CO 8d und vs. E+ 8d, $p < 0,01$; * vs. CVB+ 8d, $p < 0,01$ und vs. CO 8d sowie vs. E+ 8d, $p < 0,05$; + vs. CO 28d und vs. E+ 28d, $p < 0,01$.

3.3.3 Myokardiales Remodeling

Das myokardiale Remodeling hat einen entscheidenden Einfluss auf die linksventrikuläre Funktion. Daher wurden die Veränderungen des MMP/TIMP-Systems, der Kollagen-Synthese und Fibrose sowie des Regulators *connective-tissue-growth-factor* (CTGF), aufgrund der Zugehörigkeit zur *Cystein-rich-angiogenetic-inducer-61*, *Connective-tissue-growth-factor*, *Nephroblastoma overexpressed*-Familie auch CCN 2 genannt, untersucht.

3.3.3.1 MMPs und TIMPs

Zunächst wurden die Veränderungen der MMP- und TIMP-Expression auf der Transkriptionsebene untersucht. Dies erfolgte mittels RT-qPCR. Die Ergebnisse dieser Analysen sind in Abbildung 14 und Abbildung 15 dargestellt. Es zeigte sich, dass die CVB3-infizierten Mäuse im Vergleich zu den Kontrolltieren am 8. Tag p.i. für MMP-3, MMP-8, MMP-12, MMP-13 und TIMP-1 eine signifikante Expressionssteigerung aufwiesen. Im Detail waren die Expressionen von MMP-3 14,3-fach ($p < 0,01$), MMP-8 177-fach ($p < 0,01$), MMP-12 53,9-fach ($p < 0,01$), MMP-13 3,1-fach ($p < 0,01$) und TIMP-1 181,9-fach ($p < 0,01$) gesteigert. 28 Tage nach der CVB3-Infektion war nur noch für MMP-8 eine im Vergleich zu den Kontrolltieren 7,9-fach erhöhte ($p < 0,05$) mRNA-Expression feststellbar.

Die Therapie mit dem selektiven MR-Antagonisten reduzierte die durch die CVB3-Infektion bedingten mRNA-Expressionssteigerungen signifikant. Im Detail waren nach 8-tägiger Therapiedauer die Expressionen von MMP-3 um das 1,9-fache ($p < 0,01$), von MMP-8 um das 4,6-fache ($p < 0,01$), von MMP-12 um das 3,5-fache ($p < 0,01$), von MMP-13 um das 2,8-fache ($p < 0,05$) und von TIMP-1 um das 2,2-fache ($p < 0,01$) vermindert. Auch die signifikante MMP-8-mRNA-Expressionssteigerung 28 Tage p.i. war nach Therapie mit dem MR-Blocker 8,1-fach geringer ($p < 0,05$).

Für das wichtige MMP-9 wurde zusätzlich die Proteinexpression im myokardialen Gewebe mittels immunhistochemischer Färbung ermittelt. Die in Abbildung 16 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die CVB3-inizierten Tiere 8 und 28 Tage p.i. im Gegensatz zur MMP-9-mRNA-Expression jeweils eine 2,4-fach ($p < 0,01$) höhere MMP-9-Proteinexpression als die Kontrollgruppen aufwiesen.

Nach der Behandlung mit dem selektiven MR-Blocker konnte bei den CVB3-infizierten Mäusen nur nach 8 Versuchstagen eine signifikante Reduktion dieser Expressionssteigerung um das 2-fache ($p < 0,05$) festgestellt werden.

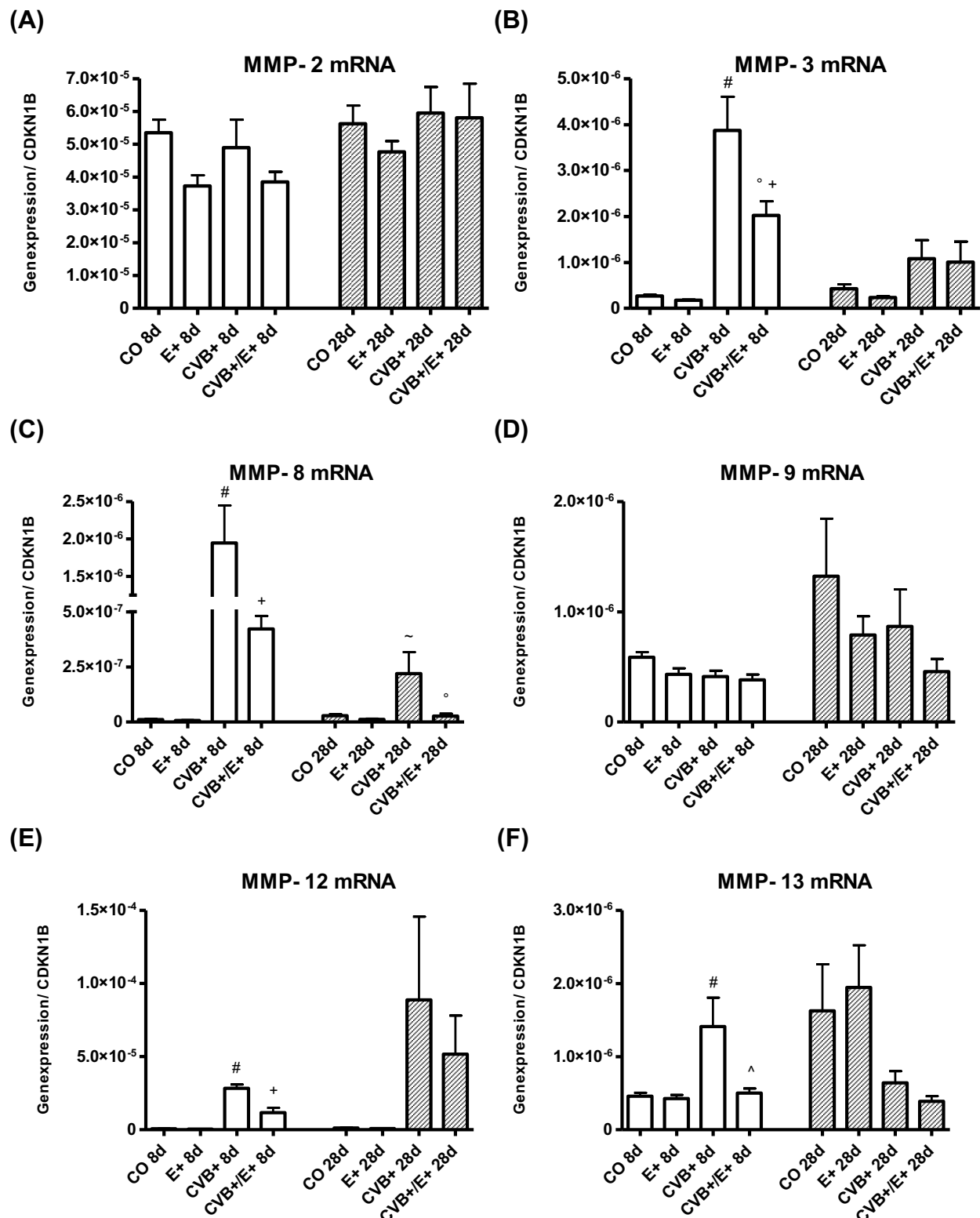


Abbildung 14 - mRNA-Expression von MMPs.

Dargestellt ist die mRNA-Expression der maßgeblich am Remodeling beteiligten Matrix-Metalloproteasen (MMPs): MMP-2 (A), MMP-3 (B), MMP-8 (C), MMP-9 (D), MMP-12 (E) und MMP-13 (F) nach 8 und 28 Versuchstagen. Die Werte wurden mittels RT-qPCR ermittelt und auf die Expression von CDKN 1B (Cyclin-abhängige-Kinase-Inhibitor 1B) bezogen. Die Versuchsgruppen CVB+ 8d und CVB+ 28d umfassten jeweils n = 7 und die übrigen Versuchsgruppen umfassten jeweils n = 8 Tiere. Die Werte sind als Mittelwert (MW) ± Standardfehler des Mittelwertes (SEM) ausgewiesen. # vs. CO 8d und E+ 8d, p < 0,01; * vs. CO 8d, p < 0,05 und vs. E+ 8d, p < 0,01; + vs. CVB+ 8d, p < 0,01; ~ vs. CO 28d und vs. E+ 28d, p < 0,05; ° vs. CVB+ 28d, p < 0,05; ^ vs. CVB+ 8d, p < 0,05.

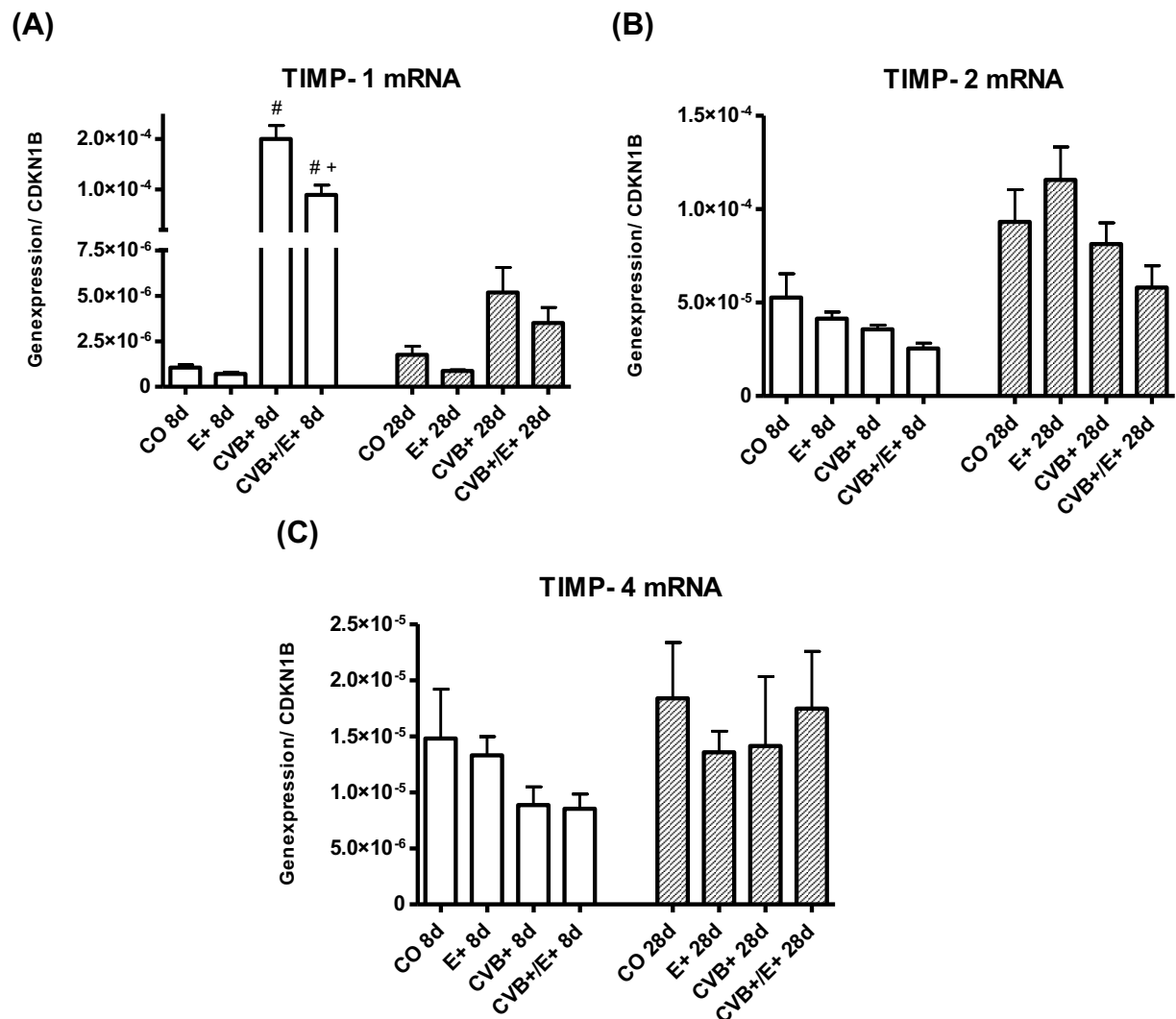


Abbildung 15 - mRNA-Expression von TIMPs.

Dargestellt ist die mRNA-Expression der maßgeblich am Remodeling beteiligten *tissue inhibitors of matrixmetalloproteases* (TIMPs): TIMP-1 (A), TIMP-2 (B) und TIMP-4 (C) nach 8 und 28 Versuchstagen. Die Werte wurden mittels RT-qPCR ermittelt und auf die Expression von CDKN 1B (Cyclin-abhängige-Kinase-Inhibitor 1B) bezogen. Die Versuchsgruppen CVB+ 8d und CVB+ 28d umfassten jeweils n = 7 und die übrigen Versuchsgruppen umfassten jeweils n = 8 Tiere. Die Werte sind als Mittelwert (MW) ± Standardfehler des Mittelwertes (SEM) ausgewiesen. # vs. CO 8d und E+ 8d, p < 0,01; + vs. CVB+ 8d, p < 0,01.

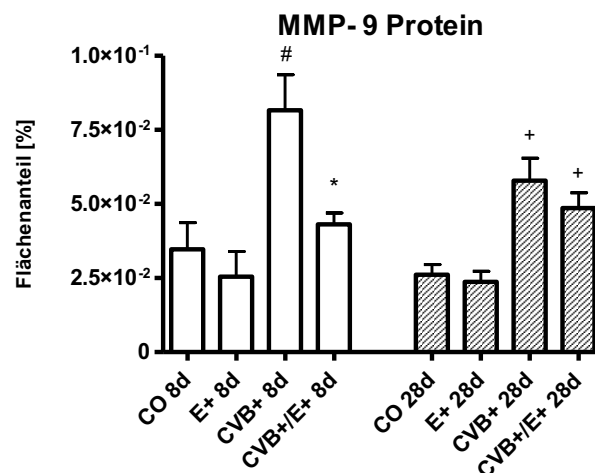


Abbildung 16 - Proteinexpression von MMP-9 (immunohistochemische Färbung).

Dargestellt ist das Ergebnis der Proteinexpressionsanalyse im myokardialen Gewebe von MMP-9 nach 8 und 28 Versuchstagen. Diese wurde mithilfe einer farbcodierten Bildanalyse von immunohistochemischen Färbungen durchgeführt. Jede Versuchsgruppe umfasste n = 8 Tiere. Pro Tier wurden 3 Gewebsschnitte mit je 20 Gesichtsfeldern analysiert. Alle Datensätze sind als Mittelwert (MW) ± Standardfehler des Mittelwertes (SEM) ausgewiesen. # vs. CO 8d und vs. E+ 8d, p < 0,01; * vs. CVB+ 8d, p < 0,05; + vs. CO 28d und vs. E+ 28d, p < 0,01.

Die Wirkung von Enzymen wird nicht ausschließlich durch die mRNA- und Proteinexpression bestimmt. Zahlreiche weitere posttranslationale Regulationsmechanismen beeinflussen sie. Daher wurde die Enzymaktivität für die beiden Gelatinasen MMP-2 und MMP-9 mittels Zymographie ermittelt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 17 dargestellt. Bedingt durch die CVB3-Infektion kam es im Vergleich zu den Kontrollgruppen nach 8 Versuchstagen zu einer 1,7-fachen Zunahme (p < 0,05) der MMP-2-Aktivität und 8,3-fachen Steigerung (p < 0,01) der MMP-9-Aktivität. Diese Aktivitätszunahmen waren nach 28 Tage p.i. lediglich angedeutet.

Wurden die CVB3-infizierten Tiere mit dem selektiven MR-Antagonisten therapiert, war nach 8 Versuchstagen die Aktivität von MMP-2 um das 1,8-fache (p < 0,05) und von MMP-9 um das 2,6-fache (p < 0,01) geringer als bei den Placebo-behandelten Mäusen. Nach 28 tägiger Therapie mit dem MR-Blocker war keine Beeinflussung der Aktivität der Gelatinasen auszumachen.

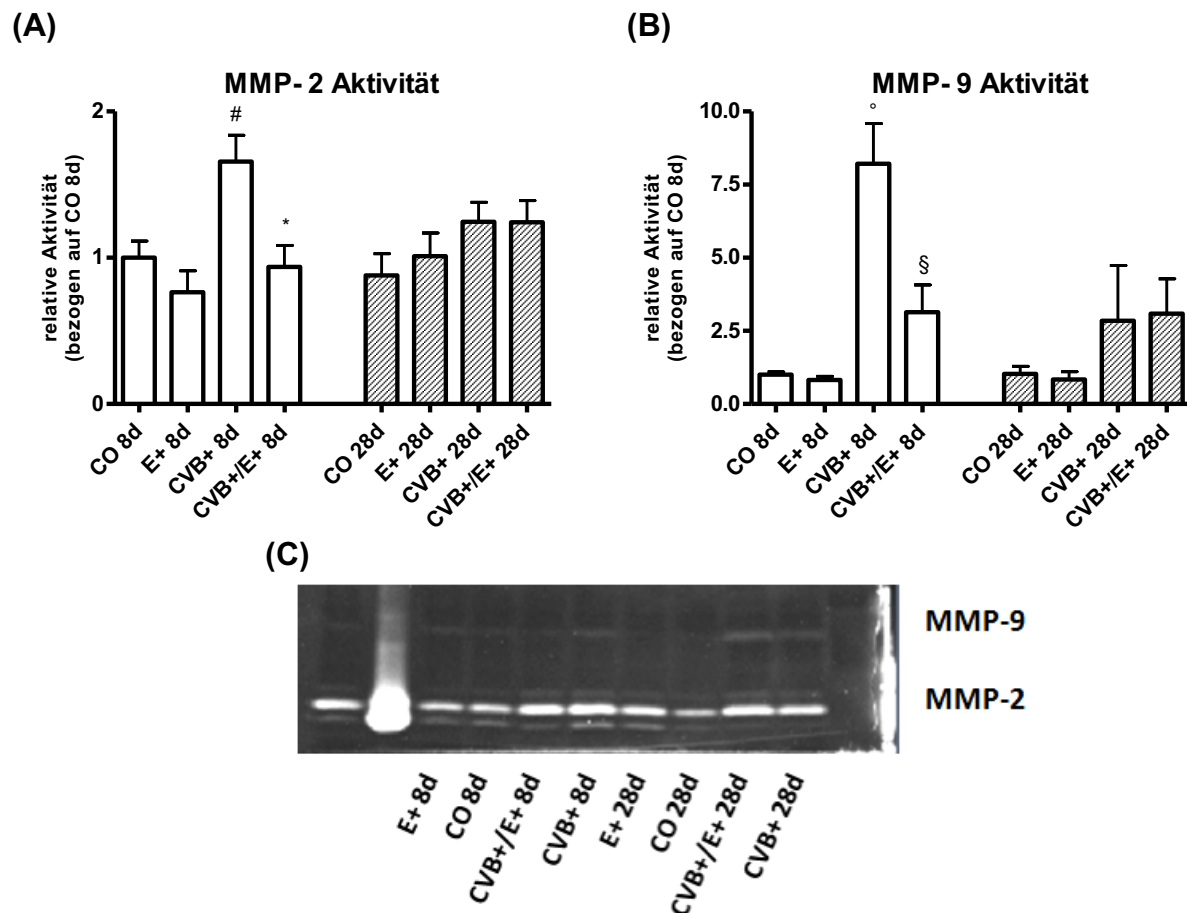


Abbildung 17 - Enzymaktivität von MMP-2 und MMP-9.

Dargestellt sind die Ergebnisse der Aktivitätsanalyse von MMP-2 (A) und MMP-9 (B) nach 8 und 28 Versuchstagen, die mittels Zymographie ermittelt wurden, und ein repräsentatives Bild eines Zymographiegels (C). Helle Banden entsprechen einer hohen Enzymaktivität. Alle Werte wurden mit dem Mittelwert der Gruppe CO 8d in Relation gesetzt. Jede Versuchsgruppe umfasste n = 8 Werte. Alle Datensätze sind als Mittelwert (MW) ± Standardfehler des Mittelwertes (SEM) ausgewiesen. [#] vs. CO 8d, p < 0,05 und vs. E+ 8d, p < 0,01; ^{*} vs. CVB+ 8d, p < 0,05; [°] vs. CO 8d und vs. E+ 8d, p < 0,01; [§] vs. CVB+/E+ 8d, p < 0,01.

3.3.3.2 Kollagen-Synthese und Fibrose

Kollagene sind wichtige Bestandteil der EZM. Insbesondere Kollagen I und Kollagen III haben großen Einfluss auf die Eigenschaften der EZM. Ihre Expression wurde in dieser Arbeit daher mittels RT-qPCR auf der mRNA-Ebene und mittels immunhistochemischer Färbung auf der Proteinebene untersucht. Der Gesamtkollagengehalt und somit der Grad der Fibrosierung wurde schließlich mittels Sirius Red-Färbung ermittelt.

Wie in Abbildung 18 zu sehen ist, führte die CVB3-Infektion im Vergleich zu den Kontrollgruppen am 8. Tag p.i. zu einem mRNA-Expressionsanstieg für Kollagen I um das 2,6-fache (p < 0,01) und Kollagen III um das 3,1-fache (p < 0,01). Auf der Proteinebene war, wie Abbildung 19 entnommen werden kann, im Vergleich zu den Kontrolltieren nur für Kollagen I eine CVB3-bedingte 2,5-fache (p < 0,01) Expressionssteigerung nachweisbar.

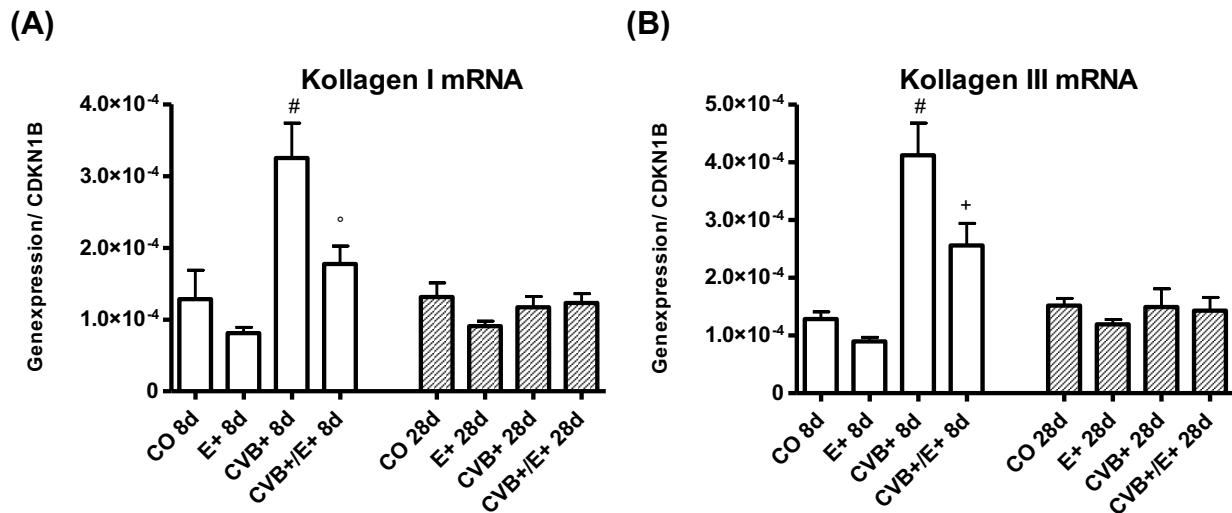


Abbildung 18 - mRNA-Expression von Kollagen I und Kollagen III.

Dargestellt ist die mRNA-Expression der wichtigen EZM-Bestandteile Kollagen I (A) und Kollagen III (B) nach 8 und 28 Versuchstagen. Die Werte wurden mittels RT-qPCR ermittelt und auf die Expression von CDKN 1B (Cyclin-abhängige-Kinase-Inhibitor 1B) bezogen. Die Versuchsgruppen CVB+ 8d und CVB+ 28d umfassten jeweils n = 7 und die übrigen Versuchsgruppen umfassten jeweils n = 8 Tiere. Die Werte sind als Mittelwert (MW) ± Standardfehler des Mittelwertes (SEM) ausgewiesen. # vs. CO 8d, p < 0,01 und vs. E+ 8d, p < 0,01; ° vs. CVB+ 8d, p < 0,05; + vs. CVB+ 8d, p < 0,05 und vs. E+ 8d, p < 0,01.

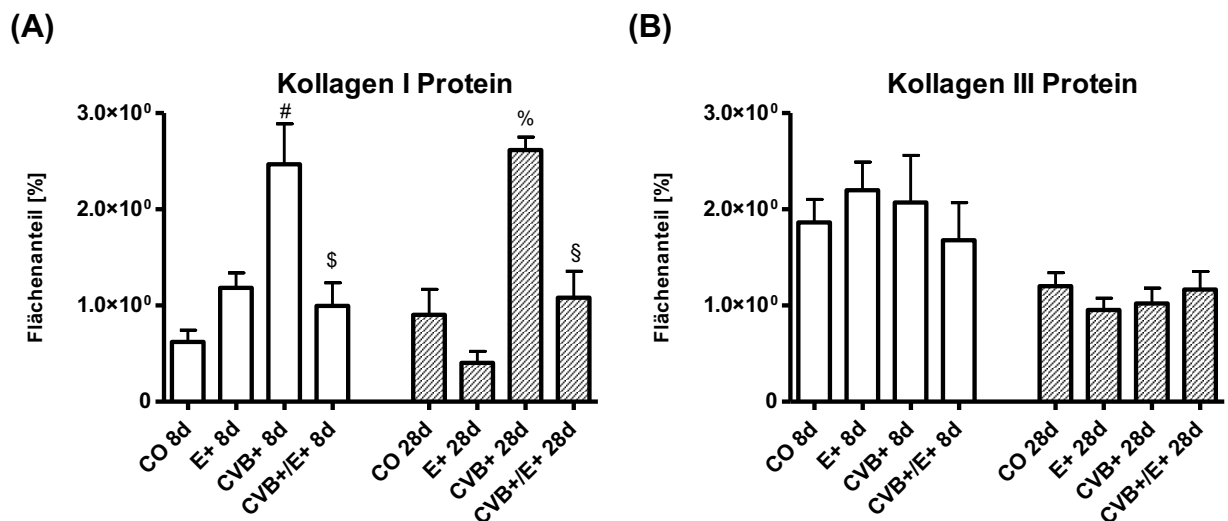


Abbildung 19 - Proteinexpression von Kollagen I und Kollagen III.

Dargestellt ist das Ergebnis der Proteinexpressionsanalyse im myokardialen Gewebe von Kollagen I (A) und Kollagen III (B) nach 8 und 28 Versuchstagen. Diese wurde mithilfe einer farbcodierten Bildanalyse von immunhistochemischen Färbungen durchgeführt. Jede Versuchsgruppe umfasste n = 8 Tiere. Pro Tier wurden 3 Gewebsschnitte mit je 20 Gesichtsfeldern analysiert. Alle Datensätze sind als Mittelwert (MW) ± Standardfehler des Mittelwertes (SEM) ausgewiesen. # vs. CO 8d, p < 0,01 und vs. E+ 8d, p < 0,01; § vs. CVB+ 8d, p < 0,01; % vs. CO 28d und vs. E+ 28d, p < 0,01; § vs. CVB+ 28d, p < 0,01 und vs. E+ 28d, p < 0,05.

Wurden CVB3-infizierten Mäuse mit dem selektiven MR-Blocker behandelt, reduzierte sich die mRNA-Expressionszunahme für Kollagen I um das 1,8-fache (p < 0,05) und Kollagen III um das 1,6-fache (p < 0,05). Auf der Proteinebene war lediglich für Kollagen I eine Veränderung detektierbar, nämlich eine 2,5-fache (p < 0,01) Proteinexpressionsreduktion. Die Proteinexpression von Kollagen III blieb trotz Veränderung auf der mRNA-Ebene hingegen unbeeinflusst.

28 Tage nach der CVB3-Infektion waren auf der mRNA-Ebene hingegen keine Expressionsunterschiede der beiden Kollagene mehr nachweisbar. Die Analyse der Proteinexpression zeigte jedoch bei den CVB3-infizierten Tieren einen 2,9-fach ($p < 0,01$) höheren Kollagen I-Gehalt, wohingegen die Kollagen III-Proteinexpression nicht beeinflusst wurde.

Die Therapie mit dem selektiven MR-Antagonisten minderte den CVB3-bedingten Anstieg des Kollagen I-Gehaltes um das 2,4-fache ($p < 0,01$). Die Kollagen III-Proteinexpression wurde dagegen erneut nicht verändert. Repräsentative Bilder der immunhistochemischen Färbung von Kollagen I sind in Abbildung 21 dargestellt.

Analog zur Proteinexpression von Kollagen I nahm, wie in Abbildung 20 und Abbildung 22 zu sehen ist, auch der Gesamtkollagengehalt und damit die Fibrosierung als Folge der CVB3-Infektion zu. Im Vergleich zu den nicht-infizierten Mäusen war er am 8. postinfektiösen Tag 2,2-fach ($p < 0,01$) und am 28. Tag p.i. 3,5-fach ($p < 0,01$) erhöht. Die Therapie mit dem MR-Blocker reduzierte diese Fibrosierung um das 1,4-fache ($p < 0,05$) nach 8 bzw. um das 2,1-fache ($p < 0,01$) nach 28 Therapietagen.

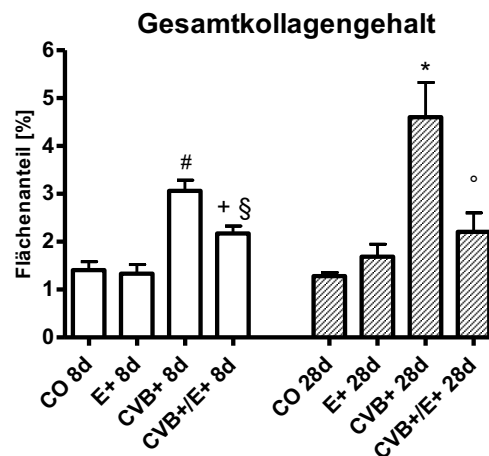


Abbildung 20 - Gesamtkollagengehalt.

Dargestellt ist der Gesamtkollagengehalt im myokardialen Gewebe nach 8 und 28 Versuchstagen. Hierfür wurde eine farbcodierte Bildanalyse an Sirius Red-gefärbte Gewebsschnitte unter polarisiertem Licht durchgeführt. Jede Versuchsgruppe umfasste $n = 8$ Tiere. Pro Tier wurden 3 Gewebsschnitte mit je 20 Gesichtsfeldern analysiert. Alle Datensätze sind als Mittelwert (MW) \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) ausgewiesen. # vs. CO 8d und vs. E+ 8d, $p < 0,01$; + vs. CO 8d und vs. E+ 8d, $p < 0,05$; § vs. CVB+ 8d, $p < 0,05$; * vs. CO 28d und vs. E+ 28d, $p < 0,01$; ° vs. CVB+ 28d, $p < 0,01$.

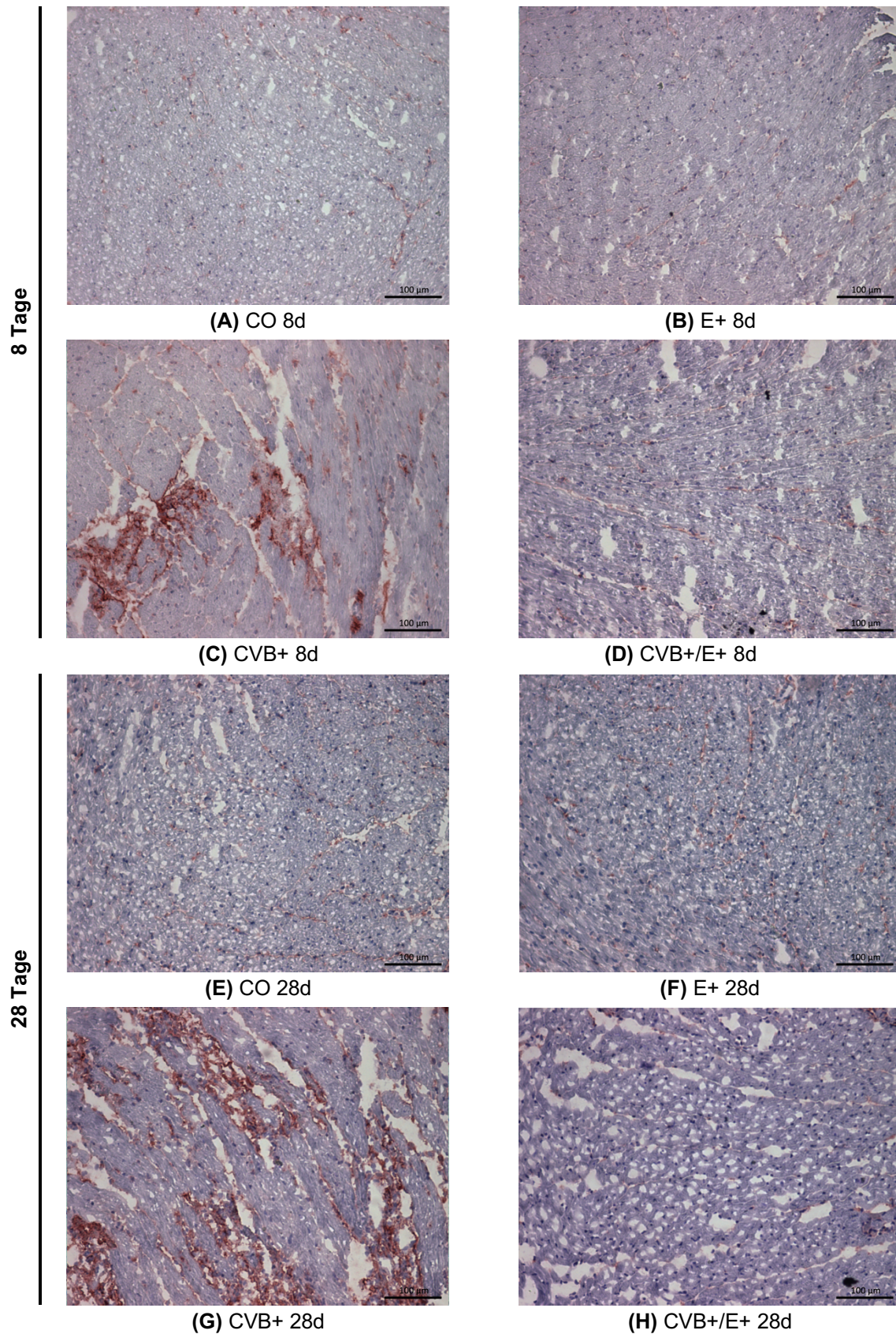


Abbildung 21 - Färbung Kollagen I.

Repräsentative immunhistologische Bilder der Anfärbung für Kollagen I im linksventrikulären Gewebe nach 8 (A-D) und 28 Versuchstagen (E-H) bei einer 200-fachen lichtmikroskopischen Vergrößerung. Die Kollagen I-spezifischen Epitope sind rot angefärbt.

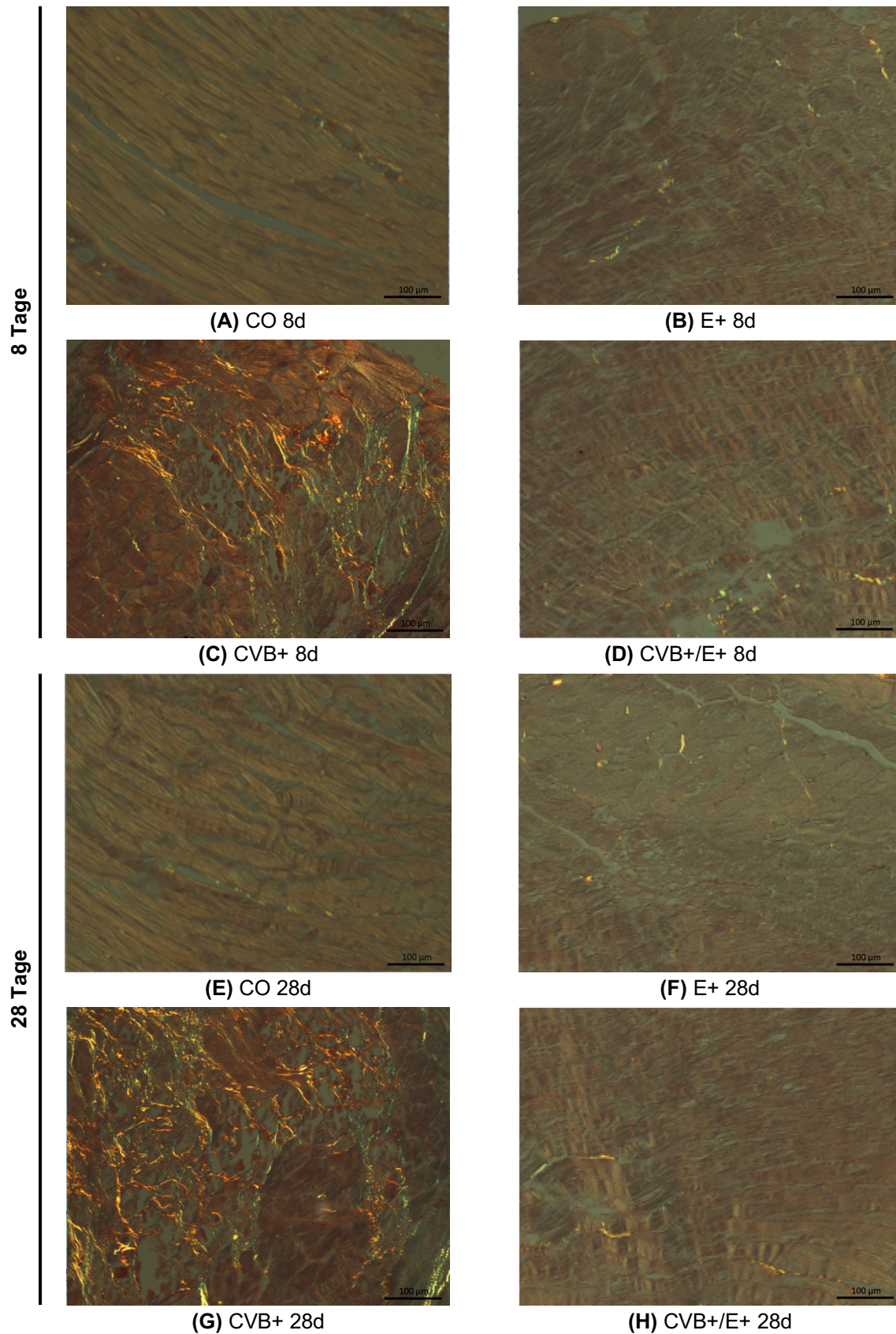


Abbildung 22 - Sirius Red-Färbung.

Repräsentative histologische Bilder der Anfärbung von Kollagenfibrillen mittels Sirius Red im linksventrikulären Gewebe nach 8 (A-D) und 28 Versuchstagen (E-H) bei einer 200-fachen Vergrößerung im Rotationspolarisationsmikroskop. Die Kollagenfasern sind gelb, orange und grün angefärbt.

3.3.3.3 Matrizelluläres Protein CCN 2/ CTGF

Ein wichtiger Induktor der Entwicklung einer myokardialen Fibrose ist das matrizelluläre Protein CCN 2, das auch als CTGF bekannt ist. Dessen mRNA-Expression wurde mittels RT-qPCR ermittelt und ist in Abbildung 23 dargestellt. 8 Tage nach Versuchsbeginn wiesen die CVB3-infizierten Tiere eine 5,5-fach ($p < 0,01$) höhere CCN 2-mRNA-Expression auf als die nicht infizierten Mäuse.

Wurden die CVB3-infizierten Tiere mit dem selektiven MR-Antagonisten therapiert, war ihre CCN 2-mRNA-Expression 1,9-fach ($p < 0,05$) geringer.

Nach 28 Versuchstagen konnten keine signifikanten Unterschiede detektiert werden.

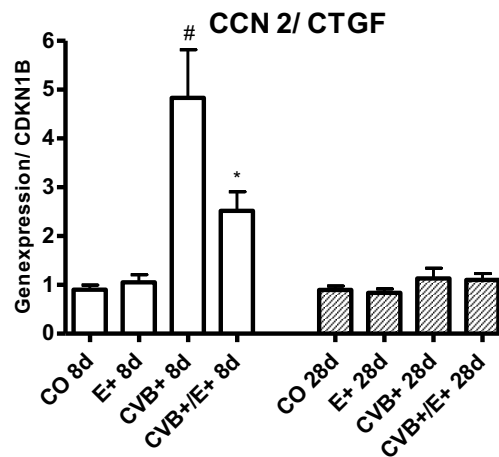


Abbildung 23 - mRNA-Expression von CCN 2/CTGF.

Dargestellt ist die mRNA-Expression des wichtigen EZM-Regulators *connective-tissue-growth-factor* (CTGF)/ CCN 2 nach 8 und 28 Versuchstagen. Die Werte wurden mittels RT-qPCR ermittelt und auf die Expression von CDKN 1B (Cyclin-abhängige-Kinase-Inhibitor 1B) bezogen. Die Versuchsgruppen CVB+ 8d und CVB+ 28d umfassten jeweils $n = 7$ und die übrigen Versuchsgruppen umfassten jeweils $n = 8$ Tiere. Die Werte sind als Mittelwert (MW) \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) ausgewiesen. # vs. CO 8d und E+ 8d, $p < 0,01$; * vs. CVB+ 8d, $p < 0,05$.

4 Diskussion

Die vorliegende Arbeit untersucht den Effekt der selektiven Blockade des MR im Rahmen einer viralen Myokarditis. Hierfür wurden SWR/J-Mäuse 8 und 28 Tagen nach der CVB3-Infektion während der subakuten und chronischen Myokarditis-Phase analysiert. Es zeigte sich, dass die Therapie der CVB3-infizierten Tiere mit dem selektiven MR-Antagonisten im Vergleich zur Plazebo-Therapie einen protektiven Einfluss hatte. Sie führte zu einer geringeren linksventrikulären Dysfunktion, einer geringeren myokardialen Entzündungsreaktion, geringeren Apoptoserate und einem reduzierten myokardialen Remodeling.

Die Ergebnisse sollen nachfolgend bezüglich der Morbidität und Mortalität, der kardialen Hämodynamik, der Entzündungsreaktion, der Apoptose und dem myokardialen Remodeling in Bezug auf die aktuelle Literatur diskutiert werden.

4.1 Selektive MR-Blockade beeinflusst Morbidität, aber nicht Mortalität

Zur Untersuchung der viralen Myokarditis sind verschiedene Mausmodelle etabliert^{74,91,190}. In dieser Arbeit fiel die Wahl auf den SWR/J-Mausstamm. Dieser entwickelt nach der CVB3-Infektion eine chronische Myokarditis mit Viruspersistenz⁹¹. Zudem korreliert die Krankheitsausprägung mit der applizierten Virusmenge¹⁹⁰. Das Körper- und das Herzgewicht stellen wichtige Maße für die Beurteilung der Morbidität dar. Kranke Tiere nehmen weniger Nahrung auf und entwickeln eine katabole Stoffwechsellage, wodurch sie an Körpergewicht verlieren¹⁹¹. Zudem entwickeln die Mäuse im Zuge einer Myokarditis eine Herzinsuffizienz mit linksventrikulärer Dysfunktion. In der vorliegenden Arbeit verloren die CVB3-infizierten Mäuse während des subakuten und chronischen Myokarditis-Stadiums, das heißt nach 8 bzw. 28-tägiger Versuchsdauer, signifikant an Körpergewicht. Das Körpergewicht der mit dem selektiven MR-Antagonisten therapierten, CVB3-infizierten Mäuse war während der chronischen Myokarditis-Phase tendenziell höher als das der Plazebo-therapierten Tiere. Der Unterschied war aber nicht signifikant. Dies deutet auf eine durch die selektive MR-Blocker-Behandlung bedingte geringere Morbidität hin. Dieser Befund deckt sich auch mit der geringeren linksventrikulären Dilatation und Dysfunktion in den hämodynamischen Messungen.

Neben der Morbidität ist die Mortalität die dramatischste Folge einer Myokarditis-Erkrankung. In der aktuellen Arbeit waren insbesondere am Übergang von der akuten zur subakuten Myokarditis-Phase einige Todesfälle und während der Mitte des subakuten Myokarditis-Stadiums, am 16. Versuchstag, ein weiterer Sterbefall auf die CVB3-Infektion zurückzuführen. Die selektive MR-Blockade hatte hierauf keinen signifikanten Einfluss. In einem anderen Virusmyokarditis-Modell, welches DBA/2-Mäuse und das Enzephalomyokarditisvirus verwandte, konnten Xiao *et al.* hingegen eine Reduktion der Mortalität nachweisen, wenn die Tiere nach der Infektion 28 Tage mit einem MR-Antagonisten behandelt wurden¹⁹². Dies könnte jedoch auch an der in diesem Virusmyokarditis-Modell insgesamt höheren Mortalität gelegen haben.

4.2 Selektive MR-Blockade reduziert die kardiale Dysfunktion

Die Aufgabe des Herzens ist es, durch stetiges Pumpen den kontinuierlichen Blutfluss im Kreislauf zu gewährleisten. Diese Pumpfunktion wird durch die Parameter der kardialen Hämodynamik beschrieben. Die Ermittlung der hämodynamischen Funktion ermöglicht, CVB3-bedingte Myokardschädigungen zu erfassen. Bei der Virusmyokarditis finden sich die ausgeprägtesten kardialen Destruktionen im Bereich des linken Ventrikels, wodurch eine linksventrikuläre Dysfunktion als gravierendste Folge resultiert^{18,193,194}. Diese bedingt die Morbidität und Mortalität des Patienten. Der Nutzen einer Therapie muss sich daher vor allem an der Reduktion der linksventrikulären Dysfunktion messen lassen. Eine negative Beeinflussung der linksventrikulären Funktion durch die Therapie von nicht-infizierten Tieren mit dem MR-Antagonisten konnte in der aktuellen Arbeit ausgeschlossen werden.

Zur Beurteilung der hämodynamischen Funktion wurden die Ergebnisse der Konduktanzkatheter-Messungen entsprechend ihrer Bedeutung für den Herzzyklus in drei Unterteilungen gegliedert: nämlich die globale, systolische und diastolische Herzfunktion.

Im Einklang mit vorausgegangenen Studien^{195,196} war in der vorliegenden Arbeit für alle Kategorien der Herzfunktion während des subakuten Myokarditis-Stadiums eine Dysfunktion zu verzeichnen. Bei der Ermittlung der globalen hämodynamischen Parameter waren eine Reduktion des Herzzeitvolumens und der linksventrikulären Ejektionsfraktion sowie eine Ventrikeldilatation, welche durch Zunahme der linksventrikulären endsystolischen und enddiastolischen Volumina charakterisiert war,

feststellbar. Die systolische Dysfunktion war durch die Abnahme des linksventrikulären endsystolischen Drucks sowie der maximalen linksventrikulären Druckanstiegsgeschwindigkeit und somit einer Abnahme der Kontraktilität gekennzeichnet. Die Abnahme der maximalen linksventrikulären Druckabfallsgeschwindigkeit, ein Maß für das Relaxationsvermögen, war als Hinweis für eine diastolische Dysfunktion vermindert.

Als Ursache für die Reduktion der globalen und systolischen Funktion während dieser Phase können die Inflammation, die vermehrten kardialen Apoptosen und das gesteigerte myokardiale Remodeling angesehen werden. Die massiv auftretende Entzündungsreaktion führt zu direkten zytopathischen Effekten auf die Kardiomyozyten, welche z.B. durch erhöhte Konzentrationen von Stickstoffmonoxid (NO) an Kontraktilität einbüßen¹⁹⁷. Die vermehrten Apoptosen bedingen eine Abnahme kontraktiler Elemente und verstärken die Entzündungsreaktion⁶². Das gesteigerte myokardiale Remodeling ist charakterisiert durch eine gesteigerte Aktivität des MMP/TIMP-Systems und eine veränderte qualitative und quantitative Zusammensetzung der EZM mit veränderten Eigenschaften der EZM und somit auch des Myokards^{103,120,121}. Es ist bekannt, dass es durch die vermehrte Aktivierung des MMP/TIMP-Systems zu einer gesteigerten Spaltung von Kollagen-Querverbindungen und zum Abbau von EZM-Komponenten kommt. Dies führt wiederum zu einer Gefügestörung mit nachfolgender Entwicklung einer linksventrikulären Dysfunktion und Dilatation¹¹³⁻¹¹⁵. Durch eine veränderte Zusammensetzung der EZM ist auch die Abnahme der diastolischen Funktion erklärbar, zumal bekannt ist, dass eine Zunahme des Kollagen I-Gehaltes mit einer Verschiebung des Verhältnisses von Kollagen I/Kollagen III und einer vermehrten Fibrosierung zu einer Zunahme der Myokardsteifigkeit und somit Abnahme des Relaxationsvermögens führt^{102,105,106}. All diese Veränderungen waren auch in der vorliegenden Arbeit nach 8 Versuchstagen signifikant nachweisbar.

Während der chronischen Phase der Myokarditis, also 28 Tage nach der CVB3-Infektion, konnte in dieser Arbeit, wie auch in einer früheren Studie von Rutschow *et al.*¹⁹⁵, ein Fortbestehen der kardialen Dysfunktion festgestellt werden. Diese nahm durch einen zusätzlichen Abfall des Schlagvolumens weiter zu. Ursächlich für das Fortbestehen und den Progress der kardialen Dysfunktion waren die gleichen Faktoren wie nach 8-tägiger Infektionsdauer. Die Entzündungsreaktion war zu diesem Zeitpunkt zwar rückläufig, aber sie persistierte. Gründe für die fortbestehende Inflammation könnten die chronische Viruspersistenz, die einen chronischen Entzündungsreiz darstellt, oder eine im Laufe der

Entzündungsreaktion entstandene Autoimmunität^{63,94,95} sein. Der Einfluss einer möglichen Autoimmunität wurde in der vorliegenden Arbeit nicht weiter untersucht. Die anhaltende Entzündungsreaktion wiederum kann als Motor für das voranschreitende Remodeling angesehen werden. Aber auch die weiterhin signifikant erhöhte Apoptoserate, auch wenn sie geringer war als während des subakuten Stadiums, könnte zum weiteren Progress der kardialen Dysfunktion beigetragen haben.

Die Therapie der CVB3-infizierten Tiere mit dem selektiven MR-Antagonisten reduzierte die linksventrikuläre Dysfunktion sowohl nach 8 als auch nach 28 Therapietagen signifikant. In der Gesamtheit betrachtet nahm der Effekt dieser Therapie in Bezug auf die Hämodynamik mit zunehmender Therapiedauer zu. Die selektive MR-Blockade führte während der subakuten Myokarditis-Phase nur zur Reduktion der linksventrikulären Dilatation als Parameter für die globale Herzfunktion und zu einem Anstieg der maximalen Druckanstiegsgeschwindigkeit als Messgröße für die systolische Herzfunktion. Dies wurde vermutlich durch die Reduktion der myokardialen Infiltration von Entzündungszellen, der Apoptoserate und des myokardialen Remodelings bedingt. Die CVB3-bedingte Minderung der linksventrikulären Ejektionsfraktion und des Herzzeitvolumens als Parameter der globalen Herzfunktion, die Reduktion des linksventrikulären endsystolischen Drucks als Parameter der systolischen Funktion und die Abnahme der maximalen linksventrikulären Druckabfallsgeschwindigkeit als diastolischer Funktionsparameter wurden durch die selektive MR-Blockade nach 8 Versuchstagen hingegen nicht signifikant beeinflusst. Im Trend waren sie jedoch geringer reduziert als bei den CVB3-infizierten, Plazebo-therapierten Tieren. Da der selektive MR-Antagonismus die Inflammation, Apoptoserate und das Remodeling deutlich verminderte, sich die kardiale Funktion jedoch nur geringfügig besserte, scheinen andere Mechanismen zur kardialen Dysfunktion beigetragen zu haben. Eine mögliche Ursache hierfür könnte sein, dass diese Funktionsstörungen durch direkte Virusschädigung bedingt sind^{62,68,69}. Diese direkte, durch das Virus bedingte Myokardschädigung findet besonders ausgeprägt während der akuten und frühen subakuten Phase der Myokarditis statt¹⁹¹. Da in der aktuellen Arbeit keine Beeinflussung der Viruslast durch den selektiven MR-Antagonismus nachweisbar war, erscheint es unwahrscheinlich, dass die direkte Virus-induzierte Schädigung durch die Therapie beeinflusst wurde.

Nach einer 28-tägigen Therapiedauer mit dem selektiven MR-Blocker waren die durch die CVB3-Infektion bedingten und oben beschriebenen globalen, systolischen und

diastolischen Funktionseinschränkungen signifikant vermindert. Die kardiale Hämodynamik entsprach somit dem Niveau der Kontrolltiere. Eine ähnliche Reduktion der linksventrikulären Dilatation sowie Verbesserung der maximalen linksventrikulären Druckanstiegs- und -abfallgeschwindigkeiten konnten auch Kuster *et al.* in ihrem durch chronische Nachlaststeigerung ausgelöstem Herzinsuffizienz-Modell an Mäusen und Wahed *et al.* in ihrem durch Myosin-Immunsierung induziertem Autoimmunmyokarditis-Modell an Ratten nach Applikation eines selektiven MR-Antagonisten nachweisen^{198,199}.

Die hämodynamischen Befunde, die die Entwicklung einer Herzinsuffizienz als Folge der CVB3-Infektion aufzeigten, wurden auch durch die mRNA-Expressionsanalyse des Biomarkers ANP bestätigt. ANP wird infolge der Herzinsuffizienz-bedingten Volumenüberbelastung des Herzens vermehrt gebildet²⁰⁰ und war infolge der CVB3-Infektion sowohl während des subakuten als auch chronischen Myokarditis-Stadiums erhöht. Die selektive MR-Blockade reduzierte die ANP-Expression analog zu den hämodynamischen Befunden signifikant. Dies kann als ergänzender Beweis für die Reduktion der kardialen Dysfunktion zu beiden Untersuchungszeitpunkten gewertet werden.

4.3 Histologische und molekularbiologische Veränderungen nach selektiver MR-Blockade

Um die durch den MR-Antagonismus bedingte Reduktion der hämodynamischen Dysfunktion zu ergründen, wurden histologische und molekularbiologische Untersuchungen durchgeführt. Aus früheren Studien ist bekannt, dass bei der Virusmyokarditis neben den direkt durch das Virus bedingten Myokardschäden^{61, 68} eine Kombination von Faktoren für die Entwicklung der kardialen Dysfunktion verantwortlich ist. Diese Faktoren sind die Entzündungsreaktion^{66,195,201-205}, die Apoptose⁶² und das myokardiale Remodeling^{103,120,121}. Sie bedingen sich in komplexer, noch nicht vollständig verstandener Weise, wechselseitig^{62,70,110,206} und wurden daher einer genaueren Analyse unterzogen.

4.3.1 Selektive MR-Blockade reduziert die myokardiale Entzündungsreaktion

Die durch die kardiale CVB3-Infektion induzierte Entzündungsreaktion ist durch die Expression von Zytokinen und Zelladhäsionsmolekülen sowie die Infiltration von Immunzellen gekennzeichnet. In Abhängigkeit von der Infektionsdauer ergeben sich hierfür jeweils charakteristische Befunde. Die myokardiale Entzündungsreaktion nimmt,

wie allgemein akzeptiert, eine Schlüsselfunktion in der Pathogenese der Virusmyokarditis ein. Im Folgenden soll herausgestellt werden wie der selektive MR-Antagonismus diese beeinflusst.

4.3.1.1 *Selektive MR-Blockade modifiziert die myokardiale Zytokinexpression nicht signifikant*

Zytokine nehmen beim Ablauf entzündlicher Prozesse eine Schlüsselrolle ein. Ihre Bedeutung für die Pathogenese der viralen Myokarditis konnte in vorangegangenen Studien herausgearbeitet werden²⁰⁷⁻²⁰⁹. Zunächst werden pro-inflammatorische Zytokine durch die virusinfizierten Kardiomyozyten sezerniert. Dies initiiert die Infiltration von Entzündungszellen. Die Immunzellen wiederum sezernieren weitere Zytokine, wodurch die Entzündungsreaktion durch ein komplexes System von Rückkopplungen inhibiert oder verstärkt wird^{66,70}. In der vorliegenden Arbeit wurde die mRNA-Expression der Zytokine TNF- α , IL-6, IL-10 und TGF- β untersucht. Infolge der CVB3-Infektion waren diese am 8. postinfektiösen Tag deutlich vermehrt exprimiert. 28 Tage nach der CVB3-Infektion waren diese Unterschiede nicht mehr signifikant.

Die selektive MR-Blockade hatte auf die Zytokinexpression keinen signifikanten Einfluss. Für die pro-inflammatorischen Zytokine TNF- α , TGF- β und IL-6 deuteten sich aber tendenziell geringere und für das eher anti-inflammatorische IL-10 eine scheinbar höhere Genexpression an. Wahed *et al.* konnten jedoch in einem Autoimmun-Myokarditis-Modell an Ratten für TGF- β eine signifikante Reduktion der mRNA-Expression infolge der selektiven MR-Blockade nachweisen¹⁹⁹. Eine Beeinflussung der Genexpression pro- und anti-inflammatorischer Zytokine erscheint somit möglich, auch wenn sie in der vorliegenden Arbeit nicht signifikant nachgewiesen werden konnte.

Einschränkend muss angemerkt werden, dass von der Zytokingenexpression, die in der vorliegenden Arbeit untersucht wurde, jedoch nicht ohne Weiteres auf die Sekretion und biologische Wirkung der Zytokine geschlossen werden darf.

4.3.1.2 *Selektive MR-Blockade reduziert die Expression des Zelladhäsionsmoleküls ICAM-1*

Zelladhäsionsmoleküle sind für myokardiale Entzündungsreaktion von großer Bedeutung. Sie werden nach der Sekretion von pro-inflammatorischen Zytokinen im entzündeten Gewebe exprimiert. Sie ermöglichen den Entzündungszellen durch die Interaktion zwischen dem Adhäsionsmolekül und dem Liganden die Adhäsion und Infiltration²¹⁰⁻²¹³. Seko *et al.* konnten in einem CVB3-induzierten murinen Myokarditis-

Modell zeigen, dass eine Antikörper-vermittelte Blockade der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 zu einer Verringerung der Immunzellinfiltration führte, die mit einer geringeren Zytotoxizität einherging^{210,213}. Auch in Myokardbiopsien von Patienten mit akuter Myokarditis oder DCM war eine vermehrte Expression von ICAM-1 nachweisbar. Diese korrelierte mit einer vermehrten Infiltration zytotoxischer Immunzellen²¹⁴. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich 8 Tage nach der CVB3-Infektion eine Zunahme der ICAM-1- und VCAM-1-Proteinexpression. Am 28. postinfektiösen Tag war hingegen lediglich die ICAM-1-Expression signifikant erhöht. Es ist bekannt, dass die Expression der beiden Zelladhäsionsmoleküle durch pro-inflammatorischen Zytokine induziert wird^{211,212}. Die vermehrte Expression der beiden Adhäsionsmoleküle könnte daher durch die vermehrte Expression von Zytokinen erklärt werden. Da die Adhäsionsmoleküle eine vermehrte Infiltration von Immunzellen nach sich ziehen, erklärt dies die gesteigerte Infiltration von CD3- und CD11b-positiven Immunzellen.

Die Therapie mit dem selektiven MR-Antagonisten reduzierte während beider Untersuchungszeitpunkte die Proteinexpression des Zelladhäsionsmoleküls ICAM-1 signifikant. Einen ähnlichen Effekt nach selektivem MR-Antagonismus konnten auch Kuster *et al.* in ihrem durch Nachlasterhöhung induzierten murinen Herzinsuffizienz-Modell nachweisen¹⁹⁸. Die Expression von ICAM-1 wird unter anderem durch Transkriptionsfaktoren wie dem Nuklearen Faktor- κ B (NF κ B) und Aktivator-Protein-1, die bei vermehrtem oxidativen Stress exprimiert werden, induziert²¹⁵. Als mögliche Ursache für die Reduktion der ICAM-1-Expression kann daher auch die durch die selektive MR-Blockade bedingte Reduktion des oxidativen Stresses angesehen werden. Dieser wurde stellvertretend durch die Bestimmung von Nitrotyrosin ermittelt. Die reduzierte ICAM-1-Expression zog eine geringere Leukozyteninfiltration und somit eine verminderte Entzündungsreaktion nach sich.

4.3.1.3 Selektive MR-Blockade reduziert die Infiltration von CD11b-positiven Immunzellen

Die myokardiale Infiltration von Abwehrzellen wurden mittels immunhistochemischer Färbungen von Oberflächenantigenen differenziert und quantifiziert. Mit Hilfe des CD3-Antigens, einem Bestandteil des T-Zell-Rezeptors, wurden die T-Lymphozyten und mittels CD11b-Antigen, dem Integrin α -M, wurden myeloide Immunzellen wie Makrophagen, aber auch NK-Zellen und neutrophile Granulozyten identifiziert. NK-Zellen und Makrophagen infiltrieren das Myokard bereits in der frühen Phase der Myokarditis⁷⁴.

Neben der Sekretion von entzündungsmodulierenden Zytokinen⁷¹ sind sie an der Viruselimination beteiligt⁸⁰ und leiten durch Antigen-Prozessierung und -Präsentation über MHC-I-Komplexe die Aktivierung des spezifischen Immunsystems ein²¹⁶. Sie führen jedoch auch zu einer Destruktion und somit Dysfunktion des Myokards^{72,217,218}. Auch die T-Zellen sind an der Pathogenese in erheblichem Maße beteiligt⁸⁴. Verschiedene Subpopulationen der T-Helferzellen beeinflussen den Entzündungsprozess durch die Ausschüttung entzündungsmodulierender Zytokine und Interaktionen mit anderen Immunzellen²¹⁹. Die zytotoxischen T-Zellen sind direkt an der Viruselimination beteiligt. Mithilfe ihres T-Zell-Rezeptors können sie virale Proteinbestandteile, die auf den MHC-I-Komplexen infizierter Zellen exprimiert werden, erkennen und diese Zellen lysieren. Hierdurch kommt es nicht nur zur Viruselimination, sondern auch zur Schädigung des Myokards⁷². Die CVB3-Infektion führte während beider Untersuchungszeitpunkte zu einer deutlichen Zunahme der Infiltration von CD3-positiven T-Zellen und CD11b-positiven myeloiden Immunzellen. Dies deckt sich mit Beobachtungen anderer Autoren^{195,220} und ist durch die in dieser Arbeit nachgewiesene Expressionssteigerung von Zytokinen und Zelladhäsionsmolekülen erklärbar.

Durch den selektiven MR-Antagonismus konnte die Infiltration der CD11b-positiven myeloiden Zellen wie Makrophagen und NK-Zellen während beider Untersuchungszeitpunkte deutlich reduziert werden, wohingegen die Anzahl infiltrierender T-Zellen nicht signifikant beeinflusst wurde. Eine Reduktion des Makrophagen-Infiltrates durch die selektive MR-Blockade, wenngleich Makrophagen nur einen Teil der Zellpopulation CD11b-positiver Zellen darstellen, ist auch aus Untersuchungen anderer kardiologischer Krankheitsentitäten bekannt. Kuster *et al.* zeigten dies in einem durch chronische Nachlastserhöhung induzierten murinen Herzinsuffizienz-Modell¹⁹⁸ und Munoz-Pacheco *et al.* wiesen dies in einem Hypertonie induzierten Herzinsuffizienz-Modell an Ratten nach²²¹. Neben dieser reduzierten Makrophageninfiltration wird in der Literatur auch eine Beeinflussung der Makrophagen-Polarisation als Therapieeffekt des selektiven MR-Antagonismus postuliert^{222,223}. Während die M1-polarisierten Makrophagen pro-inflammatorische Zytokine sezernieren und zu einer vermehrten Schädigung des Herzens führen, exprimieren M2-Makrophagen anti-inflammatorische Zytokine und haben einen eher kardioprotektiven Einfluss²²². Usher *et al.* zeigten in einem Zellkulturexperiment mit Maus-Makrophagen, dass sich diese durch Aldosteronapplikation vermehrt zu M1-Makrophagen polarisierten und sich

diese Polarisierung durch zusätzliche Applikation eines selektiven MR-Blockers unterdrücken ließ²²³. In einem transgenen Maus-Modell mit *knock-out* des MR der Makrophagen konnte die Arbeitsgruppe schließlich auch eine geringere Makrophageninfiltration, Fibrosierung und ein Zytokin-Expressionsmuster, das auf eine verminderte M1-Polarisierung schließen ließ, zeigen²²³. Es scheint daher möglich, dass auch in der vorliegenden Arbeit durch den selektiven MR-Antagonismus weniger M1-Makrophagen entstanden. Dies kann eine Ursache für die von Usher *et al.* beobachtete Verminderung des Makrophagen-Infiltrates sein, welches sich in der vorliegenden Arbeit in Form einer reduzierten Einwanderung CD11b-positiver Zellen ausdrückte. Zudem war auch in der vorliegenden Arbeit der Grad der Fibrosierung durch die selektive MR-Blockade reduziert. Die von Usher *et al.* gefundene Modifikation der Zytokinexpression von TNF- α und TGF- β ²²³ war, wie bereits erwähnt, in der vorliegenden Arbeit nicht signifikant, aber doch angedeutet. Daher könnte die These, dass der selektive MR-Antagonismus die M1-Polarisierung der Makrophagen reduziert, die verminderte Entzündungsreaktion und damit das geringere Remodeling sowie die weniger ausgeprägte kardiale Dysfunktion erklären.

Neben der Expression auf Makrophagen wird das CD11b-Antigen auch auf neutrophilen Granulozyten exprimiert²²⁴. Eine jüngst erschienene Studie von Rivadeneyra *et al.*, die die Bedeutung von neutrophilen Granulozyten bei CVB3-induzierten Myokarditiden untersuchte, konnte zeigen, dass das CVB3 neutrophile Granulozyten infiziert, in diesen aber nicht repliziert. Die CVB3-Infektion führte jedoch zu einer Zunahme der CD11b-Expression auf den neutrophilen Granulozyten und einer Verlängerung ihrer Lebenszeit²²⁵. Da eine Depletion der neutrophilen Granulozyten in einem CVB3-induzierten murinen Myokarditis-Modell 7 Tage nach der Infektion, also während des subakuten Myokarditis-Stadiums, zu einer Reduktion der Viruslast und der myokardialen Nekrosen führte, mutmaßten Rivadeneyra *et al.*, dass die neutrophilen Granulozyten einen relevanten Beitrag zur Virusverbreitung leisten könnten und durch Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine zu einer vermehrten Entzündungsreaktion und konsekutiven Gewebsschädigung beitragen würden²²⁵. Aufgrund des Anteils der neutrophilen Granulozyten im leukozytischen Infiltrat der frühen Myokarditis-Phase²²⁶ wird der in der aktuellen Arbeit gefundene Anteil CD11b-positiver Zellen, insbesondere nach 8 Versuchstagen, teils durch neutrophilen Granulozyten bedingt sein. Die Bedeutung der neutrophilen Granulozyten im Stadium der chronischen Myokarditis wurde bisher nicht

untersucht und bleibt somit noch unklar.

Untersuchungen in einem autoimmunen, murinen Glomerulonephritis-Modell konnten zeigen, dass während der dortigen akuten Entzündungsphase die selektive MR-Blockade zu einer verminderten Infiltration von neutrophilen Granulozyten, aber auch Makrophagen, führte. Als mögliche Ursache hierfür wurde eine Beeinflussung des Zytokinexpressionsmusters, wie sie im Rahmen der Makrophagenpolarisation erfolgt, diskutiert²²⁷. Ein ähnlicher Effekt des selektiven MR-Antagonisten könnte auch in der vorliegenden Arbeit zur verminderten Infiltration neutrophiler Granulozyten geführt haben. Die bereits oben diskutierte These der MR-Blockade bedingten verminderten M1-Polarisation der Makrophagen könnte eine Erklärung hierfür sein.

4.3.1.4 *Selektive MR-Blockade reduziert den nitrosaktiven Stress*

Die Bildung von reaktiven Stickstoffspezies wie NO ist insbesondere während der akuten und frühen subakuten Myokarditis-Phase von wichtiger pathophysiologischer Bedeutung. Nitrosaktiver Stress hemmt die Virusreplikation, in dem er die virale Erbinformation direkt oder die viralen Proteasen schädigt. Er ist somit für die frühe Virusabwehr wichtig und ermöglicht die Eingrenzung der Infektion²²⁸. Reaktive Stickstoffspezies als Vertreter oxidativen Stresses induzieren aber auch Apoptosen und Nekrosen. Sie führen somit zur Destruktion und Dysfunktion des Myokards²²⁹. NO wirkt aber auch direkt zytopathisch auf Kardiomyozyten und beeinträchtigt deren kontraktile Funktion¹⁹⁷. Zur Ermittlung des nitrosaktiven Stresses wurde der Gehalt an Nitrotyrosin im Gewebe ermittelt. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich, dass 8 Tage nach der CVB3-Infektion der Nitrotyrosin-Gehalt deutlich erhöht war. Dieser vermehrte oxidative Stress erklärt auch die erhöhte Apoptoserate während dieses Untersuchungszeitpunktes. Aus Untersuchungen von Siwik *et al.* an Ratten-Kardiofibroblasten ist bekannt, dass vermehrter oxidativer Stress auch zur vermehrten Synthese von MMPs und somit zu vermehrtem myokardialen Remodeling führt²³⁰. Dies kann das gesteigerte Remodeling durch die CVB3-Infektion in der vorliegenden Arbeit mit erklären. Die Bildung reaktiver Stickstoffspezies wird durch Zytokine wie TNF- α über die Aktivierung der induzierbaren NO-Synthase (iNO-Synthase) angeregt²³¹. Durch vermehrten Anfall oxidativen Stresses wird wiederum die Expression von Transkriptionsfaktoren induziert, welche wiederum die Bildung von Zytokinen fördern und somit das Entzündungsgeschehen positiv rückkoppeln²¹⁵.

Der selektive MR-Antagonismus reduzierte nach 8 Therapietagen die Bildung reaktiver Stickstoffspezies signifikant. Auch in einer Studie an Ratten mit Myosin-induzierter

Autoimmunmyokarditis konnte eine chronisch erhöhte Aktivität der iNO-Synthase nachgewiesen werden. Die beobachtete Entzündungsaktivität und myokardiale Gewebsdestruktion ließ sich bei den Kollegen durch Inhibierung der iNO-Synthase reduzieren²³². Eine Reduktion der Aktivität der iNO-Synthase scheint daher, nach Überwindung der akuten Phase der Myokarditis, den Krankheitsverlauf günstig zu beeinflussen. Dies kann, wie oben aufgeführt, an einem geringeren direkten zytopathischen Effekt auf die Kardiomyozyten, einer geringeren Apoptoserate, einer geringeren positiven Rückkopplung der Entzündungsreaktion, einem geringeren myokardialen Remodeling und konsekutiv an einer geringeren kardialen Dysfunktion liegen. Da die iNO-Synthase hauptsächlich in Makrophagen exprimiert wird⁸³, kann die durch die selektive MR-Blockade bedingte verminderte Infiltration CD11b-positiver Zellen zur Reduktion des nitrosaktiven Stresses beigetragen haben. Die Reduktion des Gehaltes an Nitrotyrosin infolge des selektiven MR-Antagonismus war in der aktuellen Arbeit jedoch stärker als die Reduktion des CD11b-positiven Immunzellinfiltrates. In dem Wissen, dass insbesondere M1-Makrophagen vermehrt reaktive Sauerstoff- und Stickstoff-Spezies synthetisieren²³³, unterstützt dies die These, dass die selektive MR-Blockade auch in der vorliegenden Arbeit zu einer verminderten M1-Polarisierung der Makrophagen mit bereits oben diskutierten positiven Effekten führte.

4.3.1.5 Selektive MR-Blockade hat keinen Effekt auf die Viruselimination

Die aus der Literatur bekannte Viruspersistenz von CVB3 bei infizierten Tieren war auch in der aktuellen Arbeit während des subakuten und chronischen Myokarditis-Stadiums nachvollziehbar^{91,190}. Die Therapie mit dem MR-Antagonisten hatte trotz Reduktion des nitrosaktiven Stresses, welcher während der akuten Myokarditis-Phase für die Eindämmung der Virusinfektion von Bedeutung ist²²⁸, und Reduktion des inflammatorischen Geschehens keinen Einfluss auf die Viruselimination.

4.3.2 Selektive MR-Blockade reduziert die myokardiale Apoptoserate

Die myokardiale Apoptose ist ein weiterer Pfeiler der myokarditischen Pathogenese. Sie stellt eine Möglichkeit dar, infektiöse Viren aus der Wirtszelle freizusetzen. Sie ermöglicht somit die Neuinfektion umgebender Kardiomyozyten⁶². Über die Aktivierung von Caspasen oder die Beeinflussung von *extracellular signal regulated kinases 1/2* (ERK 1/2)-vermittelten Signalwegen kann CVB3 selbst Apoptosen auslösen^{234,235}. Neben dieser direkt durch das Virus-bedingten Induktion, kann auch das Immunsystem den kontrollierten Zelltod initiieren. Dies kann sowohl durch Vertreter des angeborenen

Immunsystems wie NK-Zellen und Makrophagen durch die Freisetzung von Perforin oder oxidativen Stress²³⁶, als auch durch Vertreter des erworbenen Abwehrsystems wie zytotoxische T-Zellen²³⁷ erfolgen. Neben der Virusfreisetzung kommt es bei apoptotischen und prä-apoptotischen Zellen zu einer vermehrten Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine und somit Verstärkung der Entzündungsreaktion⁶². Die Untersuchung der Apoptoserate im Rahmen der Virusmyokarditis ist daher zur Beurteilung des therapeutischen Effektes des selektiven MR-Antagonismus von Interesse. In dieser Arbeit wurde die Häufigkeit der Apoptosen mittels Dead End™ Colorimetric TUNEL Methode an Gefrierschnitten untersucht. Die Apoptoserate waren, wie erwartet, 8 wie 28 Tage p.i. erhöht, wobei während der subakuten Myokarditis-Phase die Apoptosehäufigkeit deutlich höher war. Diese virusinfektionsbedingte Zunahme der Apoptoserate konnte bereits in anderen Studien nachvollzogen werden, wenngleich das Ausmaß der Apoptosen abhängig von der Vulnerabilität des Mausstamms variierte^{62,238,239}. Durch die anfangs rasche Virusreplikation mit konsekutiver Aktivierung des Immunsystems kommt es während der akuten und subakuten Phase der CVB3-induzierte Myokarditis zu einer hohen Apoptoserate⁶⁶. Im Rahmen der mit der Chronifizierung der Myokarditis einhergehenden Eindämmung der Virusreplikation und Abnahme der Entzündungsintensität, beides wurde in der vorliegenden Arbeit gefunden, könnte die Abnahme der Apoptosen im weiteren Verlauf erklärt werden.

Der selektive MR-Antagonist führte nur während des subakuten Myokarditis-Stadiums zu einer Reduktion der Apoptosehäufigkeit. Eine ähnliche Abnahme der Apoptoserate konnten auch Kuster *et al.* in ihrem durch chronische Nachlasterhöhung induzierten murinen Herzinsuffizienz-Modell nach der Therapie mit selektiven MR-Blockern nachweisen¹⁹⁸. Eine Ursache für die reduzierte Apoptoserate könnte die geringere Infiltration von direkt oder indirekt Apoptose-auslösenden Entzündungszellen und die Reduktion des Apoptose-induzierenden oxidativen Stresses sein.

4.3.3 Selektive MR-Blockade reduziert das myokardiale Remodeling

Seit längerem ist bekannt, dass qualitative und quantitative Veränderungen der EZM, als Teil eines kardialen Remodeling, zu Funktionseinschränkungen des Myokards führen^{115,240}. Zusätzlich zur Veränderung der Materialeigenschaften der EZM kommt es durch das Remodeling der EZM zu einer Änderung der Herzgeometrie, die sich negativ auf die Herzfunktion auswirken kann. Das Remodeling ist durch die Neusynthese und den Abbau von EZM-Bestandteilen charakterisiert. Verschiedenen Autoren gelang es in

myokarditischen Maus-Modellen oder entzündlichen Erkrankungen im humanen Myokard eine Assoziation zwischen gesteigertem Remodeling und kardialer Dysfunktion herzustellen^{107,195,241}. Auch die Untersuchungen dieser Arbeit konnten dies für die CVB3-Infektion zeigen. Durch den selektiven MR-Antagonismus gelang es, das Ausmaß des Remodelings und die kardiale Funktionseinschränkung zu reduzieren. In der Folge sollen die Veränderungen des MMP/TIMP-Systems und der Kollagensynthese nebst Fibrose eingehender diskutiert werden.

4.3.3.1 Selektive MR-Blockade reduziert die Aktivität des MMP/TIMP-Systems

Die Bedeutung des MMP/TIMP-Systems für das Remodeling ist unbestritten^{114,119,242,243}. Neben dem Abbau der EZM degradiert dieses System auch intrazelluläre Proteine und moduliert inflammatorische Prozesse.

In der vorliegenden Arbeit waren am 8. Tag p.i. die mRNA-Expressionen von MMP-3, MMP-8, MMP-12 und MMP-13 deutlich erhöht. Dies deutete indirekt auch auf eine vermehrte Enzymaktivität dieser MMPs hin. Diese Beobachtungen decken sich mit denen anderer Arbeitsgruppen, die dies auch im myokarditischen Maus-Modell^{195,244} oder im Rahmen anderer zur Herzinsuffizienz führender Krankheitsbilder in Ratten-Modellen^{221,245} oder beim Menschen^{242,246,247} nachwiesen. Ebenso waren in der vorliegenden Arbeit am 8. Tag p.i. die zymographisch bestimmten Aktivitäten der Gelatinasen MMP-2 und MMP-9 deutlich erhöht. Dies ist auch aus der Literatur im Rahmen der murinen Myokaritis¹⁹⁵ sowie der DCM und Myokarditis des Menschen bekannt^{246,248}. Als ein möglicher Grund für die erhöhte MMP-9-Aktivität ließ sich in der vorliegenden Arbeit eine vermehrte MMP-9-Proteinexpression feststellen. Diese wurde auch in anderen Myokarditis-Mausmodellen beobachtet^{120,244}. Da die mRNA-Expression von MMP-2 und MMP-9 durch die CVB3-Infektion in der vorliegenden Arbeit nicht signifikant beeinflusst wurde, kann die vermehrte Enzymaktivität nicht durch eine Transkriptionssteigerung erklärt werden. Vielmehr schienen die Proteinexpression und Aktivität posttranskriptionell beeinflusst worden zu sein. Untersuchungen anderer myokarditischer Maus-Modellen zeigten hingegen auch eine Steigerung der MMP-2- und MMP-9-mRNA-Expression^{120,244}, so dass auch eine transkriptionelle Beeinflussung der MMP-2- und MMP-9-Aktivität möglich scheint. Diese divergenten Ergebnisse könnten durch die verschiedenen Mausmodelle bedingt sein. Auch für MMP-12 konnte, wie in der vorliegenden Arbeit gefunden, eine vermehrte myokardiale Expression im Rahmen der humanen Enterovirus-assoziierten Myokarditis nachwiesen werden²⁴⁹.

Die festgestellten vermehrten Expressionen und Aktivitäten der MMPs könnten durch die vermehrte Infiltration von Entzündungszellen und die gesteigerte Sekretion von pro-inflammatorischen Zytokinen erklärt werden. Denn ein Großteil der MMPs und TIMPs wird hauptsächlich durch Immunzellen wie Makrophagen sezerniert^{250,251}. Deren Expression wird wiederum durch Zytokine wie TNF- α oder TGF- β stimuliert^{122-124,252,253}. Bezüglich der TIMPs, den natürlichen Inhibitoren der MMPs, konnte in der vorliegenden Arbeit für TIMP-1 eine CVB3-bedingte mRNA-Expressionssteigerung detektiert werden. Dies deckt sich mit Ergebnissen anderer Autoren^{195,251}. Neben der klassischen Inhibition von MMPs wurde für TIMP-1 auch eine Begünstigung der Infiltration von Immunzellen beschrieben²⁵¹. Da diese Immunzellen vornehmlich MMPs sezernierten^{250,251}, könnte paradoxerweise dieser Inhibitor der MMPs zu einer vermehrten Aktivierung des MMP/TIMP-Systems beigetragen haben. Nach 28-tägiger Infektionsdauer waren die Expressionen und Aktivitäten der MMPs bis auf die mRNA-Expression von MMP-8 und die Proteinexpression von MMP-9 nicht signifikant erhöht und korrelierten mit den Befunden anderer Autoren. Diese stellten ebenfalls ein Maximum der Aktivität des MMP/TIMP-Systems während des subakuten Myokarditis-Stadiums fest^{195,244}. Dies deutet daraufhin, dass dem MMP/TIMP-System während der chronischen Myokarditis-Phase eine eher untergeordnete Bedeutung zukommt und seine pathophysiologische Bedeutung vor allem während der früheren Myokarditis-Stadien zu sehen ist.

Die vermehrte Aktivität des MMP/TIMP-System führte wohl über mehrere Mechanismen zur Schädigung der myokardialen Struktur und Funktion. Durch die gesteigerte Aktivität dieses Systems wurden unterschiedliche Komponenten der EZM degradiert. Die Kollagenasen MMP-8 und MMP-13 können quervernetzte Kollagenfibrillen zu Gelatine degradieren²⁵⁴. Gelatine wird wiederum durch die Gelatinasen MMP-2 und MMP-9 abgebaut²⁴¹. MMP-2 ist zusätzlich imstande nicht-denaturierte Kollagen I-Fibrillen Kollagenasen-unabhängig abzubauen²⁵⁵ und MMP-9 kann Kollagenquerverbindungen von Kollagen I-Fibrillen spalten¹¹³. Das auch als Stromelysin bekannte MMP-3 und das Makrophagen-Elastase genannte MMP-12 spalten weitere EZM-Bestandteile wie Elastin oder Proteoglykane^{241,250}. In der Gesamtheit führt diese Degradierung von Kollagen und anderen EZM-Komponenten zu einer myokardialen Gefügestörung mit konsekutiver linksventrikulärer Dilatation und Dysfunktion^{114,241}.

Neben EZM-Proteinen sind MMPs wie z.B. MMP-2 in der Lage intrazelluläre Proteine, wie das für die Muskelkontraktion wichtige Myosin, zu degradieren und somit die Kontraktionsfähigkeit der Kardiomyozyten zu reduzieren^{256,257}. Hierdurch wird die

kardiale Funktion ebenfalls kompromittiert. Zusätzlich zu diesen Effekten ist auch ein entzündungsmodulatorischer Einfluss des MMP/TIMP-Systems bekannt. Für MMP-3, MMP-9, MMP-12 und MMP-13 konnte beispielsweise gezeigt werden, dass sie die Expression entzündungsregulierender Zytokine wie IL-1 β , INF- α und INF- γ verstärken^{110,242,249}. Sie können aber auch durch die Spaltung von Zytokinen, Chemokinen und anderen Signalmolekülen die Migration und Infiltration von Entzündungszellen beeinflussen²⁵⁸. Durch derartige Rückkopplungen modifiziert das MMP/TIMP-System die Entzündungsreaktion auf verschiedene Weise. Da auch MMPs selbst das Substrat anderer MMPs darstellen und durch Abspaltung des Pro-Peptids aktiviert werden²⁵⁹⁻²⁶¹, wurde das MMP/TIMP-System wohl auch intrinsisch in seiner Aktivität verstärkt. Dies steigerte wohl wiederum das Remodeling und konsekutiv die kardiale Dysfunktion.

Der selektive MR-Antagonismus verringerte in dieser Arbeit die gesamte durch die CVB3-Infektion bedingte Aktivitätssteigerung des MMP/TIMP-Systems 8 Tage nach der CVB3-Infektion. Mit zunehmender Infektionsdauer, 28 Tage nach der CVB3-Infektion, war hingegen nur die mRNA-Expression von MMP-8 reduziert. Eine ähnliche Aktivitätsreduktion des MMP/TIMP-Systems durch eine selektive MR-Blockade konnte auch in anderen Tier- und Zellkulturexperimenten, die sich mit entzündlichen oder nicht-entzündlichen Herzerkrankungen beschäftigten und mit einem kardialen Remodeling sowie einer Dysfunktion einhergehen, beobachtet werden. So minderte diese Therapie die MMP-13-Proteinexpression in einem Ischämie induzierten Herzinsuffizienz-Modell an Ratten²⁶², die TIMP-1-mRNA-Expression in einem Ischämie induzierten caninen Herzinsuffizienz-Modell und einem durch Nachlasterhöhung induzierten murinen Herzinsuffizienz-Modell^{198,263}, die MMP-2-Aktivität in einem eine diabetische Kardiomyopathie simulierenden Zellkulturexperiment²⁶⁴ und die MMP-9-Proteinexpression in einem Ischämie-induzierten caninen Herzinsuffizienz-Modell²⁶³. Entgegen den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit fanden die Kollegen Xiao *et al.* und Rastogi *et al.* in einem EMCV-induzierten Myokarditis-Modell an DBA/2-Mäusen und einem Ischämie-induzierten caninen Herzinsuffizienz-Modell aber auch eine Abnahme der MMP-2- und MMP-9-mRNA-Expression^{192,263}. Dies könnte den unterschiedlichen Tiermodelle und Krankheitsentitäten geschuldet sein. In der vorliegenden Arbeit gelang es erstmalig eine durch selektive MR-Blockade bedingte Minderung eines Anstiegs der MMP-3-, MMP-8- und MMP-12-mRNA-Expression und der MMP-9-Aktivität

nachzuweisen. Die durch den selektiven MR-Antagonismus bedingte verminderte Aktivität des MMP/TIMP-Systems führte mutmaßlich zu einem geringeren myokardialen Remodeling mit reduzierter EZM-Gefügestörung. Hierdurch könnten die linksventrikuläre Dilatation und Dysfunktion geringer ausgeprägt gewesen sein. Als mögliche Ursache der verminderten Aktivität des MMP/TIMP-Systems kann die geringere Inflammation angesehen werden, da die meisten MMPs durch Abwehrzellen wie Makrophagen sezerniert werden²⁵⁰. Die selektive MR-Blockade reduzierte die Infiltration der CD11b-positiven Zellen, zu denen Makrophagen gehören, und führte somit mutmaßlich zu einer geringeren Expression und Aktivierung der Komponenten des MMP/TIMP-Systems. Als weiteres Indiz deutet die gefundene verminderte MMP-12-mRNA-Expression nach 8-tägiger Therapie mit dem selektiven MR-Blocker auf eine mutmaßlich hierdurch reduzierte Polarisierung von Makrophagen zu pro-inflammatorischen M1-Makrophagen hin, da MMP-12 vor allem von M1-polarisierten Makrophagen sezerniert wird²⁴⁹.

Weitere mögliche Modulatoren sind die Zytokine. Verschiedene Studien konnten die Assoziation zwischen einer vermehrten Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine und einer gesteigerten Aktivität des MMP/TIMP-Systems nachweisen^{122,124,265,266}. In der vorliegenden Arbeit war durch den selektiven MR-Antagonismus jedoch keine signifikante Expressionsbeeinflussung der untersuchten Zytokine, sondern lediglich eine dahingehende Tendenz feststellbar. Diese könnte jedoch genügt haben, um im Zuge von negativen Rückkopplungen einen Einfluss auf das MMP/TIMP-System genommen zu haben. Es könnte aber auch sein, dass andere als die untersuchten Zytokine wie z.B. IL-1 β durch die selektive MR-Blockade beeinflusst wurden und das MMP/TIMP-System modifizierten. Aber auch eine Beeinflussung durch Zytokin-unabhängige Regulationsmechanismen scheint möglich. Zum Beispiel könnte der selektive MR-Antagonismus auch direkt die TIMP-1-Expression gemindert haben. Da für TIMP-1 neben der klassischen Funktion als Inhibitor von MMPs auch eine Begünstigung der Immunzellinfiltration und somit der Inflammationsverstärkung beschrieben wurde²⁵¹, könnte die reduzierte TIMP-1-Expression zu einer geringeren Aktivität des MMP/TIMP-Systems geführt haben. Eine weitere Aktivitätsreduktion könnte durch die Reduktion des nitrosaktiven Stresses erfolgt sein, da auch dieser das MMP/TIMP-System vermehrt aktivieren kann¹³².

4.3.3.2 *Selektive MR-Blockade reduziert die myokardiale Kollagen-Synthese und Fibrosierung*

Die Steifigkeit des Myokards wird vor allem durch Kollagen I und Kollagen III bestimmt²⁶⁷. Während Kollagen I die Widerstandsfähigkeit gegen Verformung und Dehnung ausmacht, ist Kollagen III für die Elastizität und Retraktionsfähigkeit verantwortlich¹⁰². Im Rahmen der Myokarditis sind schon länger quantitative und qualitative Veränderung des Kollagengehalts mit konsekutiver Entwicklung einer Fibrose bekannt¹⁰⁵. Die myokardiale Fibrose ist durch die Zunahme des Gesamt-Kollagens, im Besonderen durch Veränderung des Kollagen I- und Kollagen III-Gehaltes charakterisiert. Neben dem bereits diskutierten Abbau von Kollagen, z.B. durch das MMP/TIMP-System, wird der qualitative und quantitative Kollagengehalt der EZM durch die Neusynthese mitbestimmt¹⁰².

In der vorliegenden Arbeit konnte in Übereinstimmung mit Beobachtungen anderer Autoren eine Zunahme der mRNA-Expression von Kollagen I und Kollagen III nur am 8. p.i. Tag festgestellt werden^{268,269}. Auf der Proteinebene war in der vorliegenden Arbeit jedoch lediglich für Kollagen I ein vermehrter Gewebsgehalt zu detektieren. Dieser war auch noch am 28. postinfektösen Tag signifikant erhöht. Wie in der Literatur beschrieben, kam es hierdurch zu einer Verschiebung des Kollagen I/Kollagen III-Verhältnisses zugunsten von Kollagen I^{107,248,270}, wodurch sich die Eigenschaften der EZM änderten. Die von Rutschow *et al.* beschriebene Zunahme des Gesamtkollagens im Sinne einer Fibrosierung¹⁹⁵, ließ sich auch in der vorliegenden Arbeit als Folge der CVB3-Infektion nachweisen. Wie in der Literatur dargestellt, nahm sie mit zunehmender Dauer der Infektion zu und war am 28. Tag p.i. am stärksten ausgeprägt⁴³. Die Zunahme der Steifigkeit, die Abnahme der Elastizität und Zunahme der Fibrosierung trugen dann vermutlich zur beobachteten linksventrikulären Dysfunktion bei.

Durch den selektiven MR-Antagonismus gelang es in der vorliegenden Arbeit, diese Zunahmen der mRNA-Expression, Proteinexpression und Fibrosierung deutlich zu reduzieren. Ähnliche Effekte der selektiven MR-Blockade beschrieben auch Xiao *et al.* in einem EMCV-induzierten Myokarditis-Modell mit DBA/2-Mäusen und Wahed *et al.* in einem induzierten Autoimmun-Myokarditis-Modell mit Ratten. In beiden Arbeiten führte die Reduktion der Kollagen-Expression und Fibrose zudem zu einem Anstieg der Überlebenswahrscheinlichkeit^{192,199}. Ein möglicher Grund für die Reduktion der Kollagen-Synthese und Fibrose könnte die reduzierte mechanische Belastung der Myofibroblasten

sein. Es ist bekannt, dass die vermehrte mechanische Belastung dieser die Kollagen-Synthese anregt²⁷¹. Ein weiterer Grund könnte die durch den selektiven MR-Antagonismus bedingte tendenzielle Reduktion der Zytokinexpression insbesondere von TGF- β sein, da diese die Kollagen-Synthese stimulieren können²⁷². Da aber auch bekannt ist, dass Aldosteron selbst eine Kollagen-Synthese in zellkultivierten Fibroblasten auslösen kann²⁷³, könnte die selektive Blockade des MR in der vorliegenden Arbeit zur verminderten Fibrose geführt haben.

4.3.3.3 *Selektive MR-Blockade reduziert die Expression des matrizzelluläres Protein CCN 2*

Das matrizzelluläre Protein CCN 2, früher auch CTGF genannt, ist Teil der CCN-Familie. CCN ist ein Akronym aus den ersten drei Mitgliedern: *c*ystein-*r*ich-*A*ngiogenetic-*I*nducer-61, *C*TGF und *n*ephroblastoma *O*verexpressed. Es ist ein nicht-struktureller Bestandteil der EZM und moduliert die zelluläre Antwort auf verschiedene Signalmoleküle²⁷⁴. Untersuchungen zeigen, dass CCN 2 während der Entwicklung einer kardialen Fibrose erhöht ist²⁷⁵ und die Stimulation mit TGF- β zu einer vermehrten CCN 2-Expression führt²⁷⁴. CCN 2 *per se* scheint jedoch keinen pro-fibrotischen Effekt zu haben^{276,277}. Es wurde daher angenommen, dass CCN 2 die Wirkung des pro-fibrotischen Zytokins TGF- β verstärkt, indem es extrazellulär an TGF- β bindet und dessen Bindungsfähigkeit an Rezeptoren erhöht²⁷⁸. Dies verdeutlicht die Bedeutung von CCN 2 während der Entwicklung der kardialen Fibrose und konsekutiven linksventrikulären Dysfunktion, wie sie auch bei der Myokarditis beobachtet wird.

In der vorliegenden Arbeit war bei den an der Myokarditis erkrankten Tieren nur während des subakuten Myokarditis-Stadiums eine Zunahme der CCN 2-mRNA-Expression feststellbar. Auch in anderen murinen Virus- und Autoimmunmyokarditis-Studien konnten erhöhte CCN 2-Expressionen in Kombination mit einer vermehrten Kollagen-Synthese, Fibrose und Herzinsuffizienzentwicklung nachwiesen werden^{268,279,280}. Aus Zellkulturstudien an neonatalen Rattenkardiomyozyten ist bekannt, dass CCN 2 ERK 1/2-abhängige Signalwege aktivieren kann²⁸¹. Über diese Signalwege wiederum konnte in Kardiofibroblasten, aber auch Haut-, Nierenfibroblasten und Chondrosarkomzellen die Expression von Kollagenen und verschiedener MMPs induziert werden^{273,282-285}. Es scheint daher wahrscheinlich, dass auch in der vorliegenden Arbeit die vermehrte CCN 2-Expression zu einer gesteigerten Kollagen-Synthese nebst Fibrose und vermehrten Aktivierung des MMP/TIMP-System führte.

Die Therapie der CVB3-infizierten Tiere mit dem selektiven MR-Antagonisten reduzierte in der vorliegenden Arbeit nach 8 Therapietagen die CCN 2-mRNA-Expressionerhöhung signifikant. Eine ähnliche Reduktion der CCN 2-Expression durch eine selektive MR-Blockade konnten auch Lavall *et al.* in einem Zellkulturexperiment an neonatalen Kardiofibroblasten von Ratten nachweisen. Sie zeigten, dass der selektive MR-Antagonismus eine durch TGF- β -Gabe induzierte CCN 2-Mehrexpression verringerte²⁸⁶. Hierzu passend konnten Messaoudi *et al.* in einem Mausmodell feststellen, dass die Gabe von Aldosteron die Expression von CCN 2 in Kardiomyozyten stimuliert. Die Kollegen fanden mittels Chromatin-Immunpräzipitation Hinweise, dass der MR an die Promoter-Region des CCN 2 bindet und somit direkt dessen Transkription auslöst²⁸⁷. Die selektive Blockade des MR könnte in der vorliegenden Arbeit eine Reduktion der Kollagen-Synthese und Aktivierung des MMP/TIMP-Systems nach sich gezogen haben. Somit könnte die reduzierte CCN 2-Expression eine wichtige Schlüsselrolle bei der Abnahme des kardialen Remodeling gehabt haben. Da im Zellkulturexperiment von Lavall *et al.* und Messaoudi *et al.* keine Makrophagen vorhanden waren, deren Polarisation und somit Zytokinsekretion hätte beeinflusst werden können, scheint die selektive MR-Blockade über einen zusätzlichen, vermutlich Zytokin-unabhängigen Mechanismus, Einfluss auf das Remodeling zu nehmen. Es könnte aber auch sein, dass CCN 2 auch für die Unterdrückung der M1-Polarisation der Makrophagen verantwortlich ist und somit den Entzündungsprozess beeinflusst hat. Diese These bedarf jedoch weiterer Untersuchungen.

4.4 Methodenkritik und Studienlimitation

Um die Bedeutung der selektiven MR-Blockade im Rahmen der Virusmyokarditis weiter zu eruieren, wurden in einem Mausmodell die multifaktoriellen Veränderungen der hämodynamischen Funktion, des Entzündungsprozesses, der Apoptose und des Remodelings untersucht. Zur Ergänzung der mittels invasiver Konduktanzkatheter-Untersuchung gewonnenen hämodynamischen Daten wurden molekularbiologische Untersuchungen durchgeführt.

Für das Studium der kardialen Funktion und Veränderungen im Rahmen der Myokarditis sind Untersuchungen am lebenden Organismus zwingend notwendig. Aufgrund der Komplexität der Vorgänge wurde die Maus als Versuchstier gewählt. Die Verfügbarkeit vergleichbarer Studienergebnisse, die Durchführbarkeit der Untersuchungen, die relativ kurze Generationsdauer und der geringe Aufwand in Bezug auf die Haltung und

Behandlung begünstigten diese Entscheidung. Die Wahl des CVB3-induzierten Myokarditis-Modells in einem SWR/J-Mausstamm reflektiert hierbei nur einen Aspekt der Krankheitsentität Myokarditis. Zum einen besitzen die unterschiedlichen Myokarditis-Auslöser einen individuellen Krankheitsverlauf mit teils individueller Pathophysiologie. Der in der vorliegenden Arbeit nachgewiesene positive Effekt des MR-Antagonismus auf pathophysiologische Mechanismen lässt sich somit nicht automatisch auf die Ätiologie aller Myokarditiden übertragen. Zum anderen wurde mit dem SWR/J-Mausstamm eine genetisch weitestgehend homogene Versuchsgruppe untersucht, die eine ähnliche Immunkompetenz besitzt. Dies ermöglichte eine Reproduzierbarkeit des Krankheitsverlaufs. Für gewöhnlich unterscheiden sich verschiedene Individuen aber aufgrund ihrer mehr oder weniger vorhandenen genetischen Varianz in ihrer Immunkompetenz. Hierdurch sind verschiedene Krankheitsverläufe und damit auch pathophysiologische Abläufe möglich^{64,74,91,190}. Die gewonnenen Daten können daher nicht ohne Weiteres auf andere Mausstämme oder Myokarditiden anderer Ätiologien übertragen werden. In der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich männliche Mäuse untersucht. Dies erfolgte aus tierschutzrechtlichen Gründen, da eine parallele Untersuchung beider Geschlechter in ausreichend großen Gruppen nicht möglich war. Bei der Konzeption der vorliegenden Arbeit wurde daher angenommen, dass bei männlichen Mäusen mögliche Effekte des selektiven MR-Antagonisten besser zu detektieren sind, da für diese schwerere Krankheitsverläufe von CVB3-induzierten Myokarditiden bekannt waren²⁸⁸⁻²⁹¹. Die vorliegenden Ergebnisse dürfen daher nicht ohne weiteres auf weibliche Mäuse übertragen werden.

Zur Realisierung der selektiven MR-Blockade wurde Eplerenon verwendet. Aufgrund bekannter Unterschiede bezüglich der Selektivität für Steroidrezeptoren lassen sich die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Daten nicht unkritisch auf andere MR-Antagonisten übertragen. Ähnliche Effekte sind aber wahrscheinlich.

In der vorliegenden Arbeit lag die täglich applizierte, gewichtsbezogene Eplerenon-Dosis, relativ gesehen, deutlich über der für den Menschen empfohlenen Dosis. Dies ist der unterschiedlichen Pharmakokinetik von Menschen und Mäusen geschuldet. Zum Zeitpunkt der Konzeption dieser Arbeit lagen verschiedene Mausstudien vor, welche die Wirkung von Eplerenon untersuchten. Die meisten Arbeiten verwandten eine Eplerenon-Tagesdosis von 200 mg/kg KG^{153,198,292-297}. Wir entschieden uns ebenfalls für die tägliche Applikation dieser Dosis, da einige dieser Studien auch den Effekt auf nicht erkrankte

Mäuse untersuchten und hierbei keine Beeinträchtigungen des arteriellen Blutdrucks, der linksventrikulären Funktion und Volumina sowie der Natrium- oder Kaliumhomöostase feststellten^{153,198,296,297}. Auch neuere Studien haben diese Dosis verwendet²⁹⁸⁻³⁰⁰.

Die *in vivo* Erhebung der hämodynamischen Parameter mittels Konduktanzkatheter-Methode gilt allgemein als sehr valide Methode³⁰¹. Vergleichbare weniger invasive Methoden wären die kardiale Magnetresonanztomographie oder die Echokardiographie gewesen. Eine kardiale Magnetresonanztomographie war für die aktuelle Untersuchung nicht verfügbar. Die Echokardiographie ist besser verfügbar, ermöglicht jedoch nicht die Erfassung aller Parameter. Insbesondere sind hier vor- und nachlastabhängige Parameter zu nennen. Daher fiel die Wahl auf die Konduktanzkatheter-Untersuchung.

Um ein möglichst unverfälschtes Bild der kardialen Funktion zu erhalten wurden die Mäuse vor der hämodynamischen Messung analgosediert. Dies sollte die Tiere von Einflüssen wie Stress und Schmerzen abschirmen, die die Herzfunktion unter anderem über Katecholaminfreisetzung modifizieren. Aber auch der Einsatz von Thiopental zur Analgosedierung kann bei Überdosierung die kardiale Funktion kompromittieren. Daher wurde Thiopental zunächst gewichtsadaptiert verabreicht und anschließend wirkungsorientiert ggf. nachappliziert. Untersuchungen an nicht analgosedierten Mäusen sind in der Literatur beschrieben³⁰², kamen aber aufgrund der hiermit verbundenen Schmerzreize und aus Tierschutzgründen, welche den möglichen zusätzlichen Erkenntnisgewinn überwogen, nicht infrage.

Die molekularbiologischen Untersuchungen unterliegen ebenfalls Einschränkungen. Für die Anfertigung von Gewebsschnitten wurde das Myokard zuvor in Paraffin eingebettet oder bei -80°C tiefgekühlt. Durch diese Vorgänge sind mögliche Veränderungen der Antigene nicht auszuschließen. Ebenso könnte die TUNEL-Methode zur Quantifizierung der Apoptosen durch DNA-Veränderungen nekrotischer Zellen, welche denen apoptotischer Zellen ähneln können, falsch positiv beeinflusst worden sein³⁰³. Aber auch die Gewebeproben für die Genexpressionsanalysen und Durchführung der Aktivitätsbestimmung von MMP-2 und MMP-9 könnten durch die Zwischenlagerung bei -80°C modifiziert worden sein.

Bei der Beurteilung der molekularbiologischen Befunde muss berücksichtigt werden, dass von den Ergebnissen der Genexpressionsanalysen aufgrund möglicher posttranskriptioneller Regulationsmechanismen nicht automatisch auf die

Proteinexpression geschlossen werden kann. Zudem kann von der nachweisbaren Proteinmenge, aufgrund verschiedener posttranslationaler Modifikationen, nicht ohne weiteres auf die Protein-/Enzymaktivität geschlossen werden. Der Nachweis von gleichzeitig auftretenden molekularbiologischen Veränderungen ist auch kein zwingendes Indiz für eine kausale Assoziation oder einen zugrundeliegenden Mechanismus. Bei künftig weitergehenden Untersuchungen sollten hier auch Western Blot-Untersuchungen erwogen werden.

Neben diesen grundsätzlichen Einschränkungen sollten bei der Wertung der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weitere Einschränkungen beachtet werden. Bei der vorliegenden Arbeit handelte es sich um eine Pilotstudie mit nur geringer Tierzahl pro Gruppe. Die sich in dieser Arbeit andeutenden Tendenzen, insbesondere bei der Genexpression, hätten bei einer größeren Fallzahl möglicherweise signifikant sein können. Zudem wurden, bis auf die Erhebung des Ausgangsgewichts, alle Untersuchungen am Ende der jeweiligen Behandlungsdauer durchgeführt. Sie geben somit nur punktuell Einblick in ein sonst dynamisches Krankheitsgeschehen und damit die Wirkung des selektiven MR-Antagonismus. Aufgrund des gewählten Studiendesigns lassen sich auch keine Rückschlüsse ziehen, welchen Effekte eine länger als 28 Tage dauernde selektive MR-Blockade gehabt hätte. Ebenso wenig kann die aktuelle Arbeit Auskunft darüber geben, welches der optimale Zeitpunkt zur Einleitung des selektiven MR-Antagonismus ist oder ob der Therapiestart zu jedem Zeitpunkt sinnvoll ist.

Da das Entzündungsgeschehen, die Apoptose und das myokardiale Remodeling bei allen Auslösern und Verläufen der Myokarditis eine zentrale Rolle spielen, scheint ein ähnlicher therapeutischer Effekt der selektiven MR-Blockade auch bei Myokarditiden anderer Ätiologien wahrscheinlich zu sein. Bei der Beurteilung der Ergebnisse dieser Arbeit muss aber berücksichtigt werden, dass diese in einem Maus-Modell erhoben wurden. Eine Übertragung der Resultate auf den Menschen sollte nicht unkritisch erfolgen. Es existieren bereits mehrere große Studien, die sich mit dem Einfluss von MR-Antagonisten bei Patienten mit einer Herzinsuffizienz unterschiedlicher Genese beschäftigten^{165, 168, 169, 304, 305}. Diese umfassten teils auch Patienten mit inflammatorischer Kardiomyopathie. Jedoch stehen explizite Untersuchungen von Patienten mit Myokarditis oder inflammatorischer Kardiomyopathie noch aus. Durch solche klinischen Studien könnte versucht werden den Einfluss der MR-Blockade auf die kardiale Funktion besser zu verstehen. Die Gewinnung von Verlaufsm yokardbiopsien bei

mit selektiven MR-Antagonisten therapierten Myokarditis-Patienten könnte zudem untersucht, ob die in der vorliegenden, aber auch in anderen tierexperimentellen Arbeiten erhobenen histologischen und molekularbiologischen Befunde auch beim Menschen nachvollzogen werden können.

In zukünftigen Tier- oder Zellkulturexperimenten könnte zudem versucht werden, die Wirkmechanismen des selektiven MR-Antagonismus genauer zu ergründen. Die komplexe Regulation der inflammatorischen Immunantwort, des MMP/TIMP-Systems, der Apoptoseinduktion und anderer Pathomechanismen bedürfen weiterer Abklärung.

Literaturverzeichnis

1. Corvisart J. *Essai sur les maladies et les lesions organisque du coeur*. Gates J MMSS 1806;182:299-303.
2. Sobernheim J. *Praktische Diagnostik der inneren Krankheiten mit vorzüglicher Rücksicht auf pathologische Anatomie*. Hirschwald, Berlin 1837:118-20.
3. Kölliker R. *Handbuch der Gewebelehre* 1867;3. Auflage.
4. Aretz HT, Billingham ME, Edwards WD, Factor SM, Fallon JT, Fenoglio JJ, Jr., Olsen EG, Schoen FJ. Myocarditis. A histopathologic definition and classification. *Am J Cardiovasc Pathol* 1987;1:3-14.
5. 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;93:841-2.
6. Maisch B, Portig I, Ristic A, Hufnagel G, Pankuweit S. Definition of inflammatory cardiomyopathy (myocarditis): on the way to consensus. A status report. *Herz* 2000;25:200-9.
7. Magnani JW, Dec GW. Myocarditis: current trends in diagnosis and treatment. *Circulation* 2006;113:876-90.
8. Global Burden of Disease Study C. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 301 acute and chronic diseases and injuries in 188 countries, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet* 2015;386:743-800.
9. Martino T, Liu P, Sole M, M. P. Enteroviral myocarditis and dilated cardiomyopathy: a review of clinical and experimental studies. In: H R, ed. *Human Enterovirus Infections*. Washington, DC: ASM Press; 1995:291-351.
10. Maron BJ, Harris KM, Thompson PD, Eichner ER, Steinberg MH. Eligibility and Disqualification Recommendations for Competitive Athletes With Cardiovascular Abnormalities: Task Force 14: Sickle Cell Trait: A Scientific Statement From the American Heart Association and American College of Cardiology. *J Am Coll Cardiol* 2015;66:2444-6.
11. 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;333:269-75.
12. 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;28:1326-33.

13. Magnani JW, Danik HJ, Dec GW, Jr., DiSalvo TG. Survival in biopsy-proven myocarditis: a long-term retrospective analysis of the histopathologic, clinical, and hemodynamic predictors. *Am Heart J* 2006;151:463-70.
14. Okuni M, Yamada T, Mochizuki S, Sakurai I. Studies on myocarditis in childhood, with special reference to the possible role of immunological process and the thymus in the chronicity of the disease. *Jpn Circ J* 1975;39:463-70.
15. Drory Y, Turetz Y, Hiss Y, Lev B, Fisman EZ, Pines A, Kramer MR. Sudden unexpected death in persons less than 40 years of age. *Am J Cardiol* 1991;68:1388-92.
16. Nippoldt TB, Edwards WD, Holmes DR, Jr., Reeder GS, Hartzler GO, Smith HC. Right Ventricular endomyocardial biopsy: clinicopathologic correlates in 100 consecutive patients. *Mayo Clin Proc* 1982;57:407-18.
17. Vasiljevic JD, Kanjuh V, Seferovic P, Sesto M, Stojsic D, Olsen EG. The incidence of myocarditis in endomyocardial biopsy samples from patients with congestive heart failure. *Am Heart J* 1990;120:1370-7.
18. Herskowitz A, Campbell S, Deckers J, Kasper EK, Boehmer J, Hadian D, Neumann DA, Baughman KL. Demographic features and prevalence of idiopathic myocarditis in patients undergoing endomyocardial biopsy. *Am J Cardiol* 1993;71:982-6.
19. Blankenhorn MA, GALL EA. Myocarditis and myocardosis; a clinicopathologic appraisal. *Circulation* 1956;13:217-23.
20. Fabre A, Sheppard MN. Sudden adult death syndrome and other non-ischaemic causes of sudden cardiac death. *Heart* 2006;92:316-20.
21. Brock R. Functional obstruction of the left ventricle; acquired aortic subvalvar stenosis. *Guys Hosp Rep* 1957;106:221-38.
22. Caforio AL, Pankuweit S, Arbustini E, Basso C, Gimeno-Blanes J, Felix SB, Fu M, Helio T, Heymans S, Jahns R, Klingel K, Linhart A, Maisch B, McKenna W, Mogensen J, Pinto YM, Ristic A, Schultheiss HP, Seggewiss H, Tavazzi L, Thiene G, Yilmaz A, Charron P, Elliott PM. Current state of knowledge on aetiology, diagnosis, management, and therapy of myocarditis: a position statement of the European Society of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases. *Eur Heart J* 2013;34:2636-48d.
23. Elliott P, Andersson B, Arbustini E, Bilinska Z, Cecchi F, Charron P, Dubourg O, Kühl U, Maisch B, McKenna WJ, Monserrat L, Pankuweit S, Rapezzi C, Seferovic P, Tavazzi L, Keren A. Classification of the cardiomyopathies: a position statement from the European Society Of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases. *Eur Heart J* 2008;29:270-6.
24. 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;1:1120-3.

25. Kühl U, Noutsias M, Seeberg B, Schannwell M, Welp LB, Schultheiss HP. Chronic inflammation in the myocardium of patients with clinically suspected dilated cardiomyopathy. *J Card Fail* 1994;1:13-25.
26. Noutsias M, Pauschinger M, Kühl U, Schultheiss HP. Myocarditis and dilated cardiomyopathy. New methods in diagnosis and therapy. *MMW Fortschr Med* 2002;144:36-40.
27. Ellis CR, Di ST. Myocarditis: basic and clinical aspects. *Cardiol Rev* 2007;15:170-7.
28. Maisch B, Pankuweit S. Current treatment options in (peri)myocarditis and inflammatory cardiomyopathy. *Herz* 2012;37:644-56.
29. Johnson DB, Balko JM, Compton ML, Chalkias S, Gorham J, Xu Y, Hicks M, Puzanov I, Alexander MR, Bloomer TL, Becker JR, Slosky DA, Phillips EJ, Pilkinton MA, Craig-Owens L, Kola N, Plautz G, Reshef DS, Deutsch JS, Deering RP, Olenchock BA, Lichtman AH, Roden DM, Seidman CE, Koralnik IJ, Seidman JG, Hoffman RD, Taube JM, Diaz LA, Jr., Anders RA, Sosman JA, Moslehi JJ. Fulminant Myocarditis with Combination Immune Checkpoint Blockade. *N Engl J Med* 2016;375:1749-55.
30. Mahmood SS, Fradley MG, Cohen JV, Nohria A, Reynolds KL, Heinzerling LM, Sullivan RJ, Damrongwatanasuk R, Chen CL, Gupta D, Kirchberger MC, Awadalla M, Hassan MZO, Moslehi JJ, Shah SP, Ganatra S, Thavendiranathan P, Lawrence DP, Groarke JD, Neilan TG. Myocarditis in Patients Treated With Immune Checkpoint Inhibitors. *J Am Coll Cardiol* 2018;71:1755-64.
31. Bowles NE, Ni J, Kearney DL, Pauschinger M, Schultheiss HP, McCarthy R, Hare J, Bricker JT, Bowles KR, Towbin JA. Detection of viruses in myocardial tissues by polymerase chain reaction. evidence of adenovirus as a common cause of myocarditis in children and adults. *J Am Coll Cardiol* 2003;42:466-72.
32. 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;111:887-93.
33. Matsumori A. Hepatitis C virus infection and cardiomyopathies. *Circ Res* 2005;96:144-7.
34. Patane S, Marte F, Sturiale M, Dattilo G, Albanese A. Myocarditis and cardiomyopathy HIV associated. *Int J Cardiol* 2011;146:e56-e7.
35. Warren-Gash C, Smeeth L, Hayward AC. Influenza as a trigger for acute myocardial infarction or death from cardiovascular disease: a systematic review. *Lancet Infect Dis* 2009;9:601-10.
36. Kandolf R, Hofschneider PH. Viral heart disease. *Springer Semin Immunopathol* 1989;11:1-13.

37. Felker GM, Thompson RE, Hare JM, Hruban RH, Clemetson DE, Howard DL, Baughman KL, Kasper EK. Underlying causes and long-term survival in patients with initially unexplained cardiomyopathy. *N Engl J Med* 2000;342:1077-84.
38. Rosamond W, Flegal K, Furie K, Go A, Greenlund K, Haase N, Hailpern SM, Ho M, Howard V, Kissela B, Kittner S, Lloyd-Jones D, McDermott M, Meigs J, Moy C, Nichol G, O'Donnell C, Roger V, Sorlie P, Steinberger J, Thom T, Wilson M, Hong Y. Heart disease and stroke statistics--2008 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation* 2008;117:e25-146.
39. 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;112:1965-70.
40. McCarthy RE, III, Boehmer JP, Hruban RH, Hutchins GM, Kasper EK, Hare JM, Baughman KL. Long-term outcome of fulminant myocarditis as compared with acute (nonfulminant) myocarditis. *N Engl J Med* 2000;342:690-5.
41. Ammirati E, Cipriani M, Lilliu M, Sormani P, Varrenti M, Raineri C, Petrella D, Garascia A, Pedrotti P, Roghi A, Bonacina E, Moreo A, Bottiroli M, Gagliardone MP, Mondino M, Ghio S, Totaro R, Turazza FM, Russo CF, Oliva F, Camici PG, Frigerio M. Survival and Left Ventricular Function Changes in Fulminant Versus Nonfulminant Acute Myocarditis. *Circulation* 2017;136:529-45.
42. Veronese G, Ammirati E, Cipriani M, Frigerio M. Fulminant myocarditis: Characteristics, treatment, and outcomes. *Anatol J Cardiol* 2018.
43. Esfandiarei M, McManus BM. Molecular biology and pathogenesis of viral myocarditis. *Annu Rev Pathol* 2008;3:127-55.
44. 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;89:2582-9.
45. Schultheiss HP, Kühl U. Why is diagnosis of infectious myocarditis such a challenge? *Expert Rev Anti Infect Ther* 2011;9:1093-5.
46. Lurz P, Luecke C, Eitel I, Fahrenbach F, Frank C, Grothoff M, de Waha S, Rommel KP, Lurz JA, Klingel K, Kandolf R, Schuler G, Thiele H, Gutberlet M. Comprehensive Cardiac Magnetic Resonance Imaging in Patients With Suspected Myocarditis: The MyoRacer-Trial. *J Am Coll Cardiol* 2016;67:1800-11.
47. Ammirati E, Moroni F, Sormani P, Peritore A, Milazzo A, Quattrocchi G, Cipriani M, Oliva F, Giannattasio C, Frigerio M, Roghi A, Camici PG, Pedrotti P. Quantitative changes in late gadolinium enhancement at cardiac magnetic resonance in the early phase of acute myocarditis. *Int J Cardiol* 2017;231:216-21.
48. Lieberman EB, Hutchins GM, Herskowitz A, Rose NR, Baughman KL. Clinicopathologic description of myocarditis. *J Am Coll Cardiol* 1991;18:1617-26.

49. Falke D. Picorna-Viren. In: Hahn H FD, Klein P, ed. Medizinische Mikrobiologie. 2 ed. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag; 1994.
50. Haller O. Viren als Krankheitserreger. In: FH K, EC B, RM Z, O H, J E, P D, eds. Taschenlehrbuch Medizinische Mikrobiologie. 11 ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2005:449-553.
51. Kim KS, Hufnagel G, Chapman NM, Tracy S. The group B coxsackieviruses and myocarditis. *Rev Med Virol* 2001;11:355-68.
52. Baboonian C, Davies MJ, Booth JC, McKenna WJ. Coxsackie B viruses and human heart disease. *Curr Top Microbiol Immunol* 1997;223:31-52.
53. Mena I, Perry CM, Harkins S, Rodriguez F, Gebhard J, Whitton JL. The role of B lymphocytes in coxsackievirus B3 infection. *Am J Pathol* 1999;155:1205-15.
54. Bultmann BD, Klingel K, Sotlar K, Bock CT, Baba HA, Sauter M, Kandolf R. Fatal parvovirus B19-associated myocarditis clinically mimicking ischemic heart disease: an endothelial cell-mediated disease. *Hum Pathol* 2003;34:92-5.
55. Bock CT, Klingel K, Aberle S, Duechting A, Lupescu A, Lang F, Kandolf R. Human parvovirus B19: a new emerging pathogen of inflammatory cardiomyopathy. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 2005;52:340-3.
56. Klingel K, Sauter M, Bock CT, Szalay G, Schnorr JJ, Kandolf R. Molecular pathology of inflammatory cardiomyopathy. *Med Microbiol Immunol* 2004;193:101-7.
57. Nicholson-Weller A, Wang CE. Structure and function of decay accelerating factor CD55. *J Lab Clin Med* 1994;123:485-91.
58. Leslie K, Blay R, Haisch C, Lodge A, Weller A, Huber S. Clinical and experimental aspects of viral myocarditis. *Clin Microbiol Rev* 1989;2:191-203.
59. Wessely R. Coxsackieviral replication and pathogenicity: lessons from gene modified animal models. *Med Microbiol Immunol* 2004;193:71-4.
60. Van Dyke TA, Flanagan JB. Identification of poliovirus polypeptide P63 as a soluble RNA-dependent RNA polymerase. *J Virol* 1980;35:732-40.
61. McManus BM, Chow LH, Wilson JE, Anderson DR, Gulizia JM, Gauntt CJ, Klingel KE, Beisel KW, Kandolf R. Direct myocardial injury by enterovirus: a central role in the evolution of murine myocarditis. *Clin Immunol Immunopathol* 1993;68:159-69.
62. Saraste A, Arola A, Vuorinen T, Kyto V, Kallajoki M, Pulkki K, Voipio-Pulkki LM, Hyypia T. Cardiomyocyte apoptosis in experimental coxsackievirus B3 myocarditis. *Cardiovasc Pathol* 2003;12:255-62.
63. Feldman AM, McNamara D. Myocarditis. *N Engl J Med* 2000;343:1388-98.
64. Belkaya S, Kontorovich AR, Byun M, Mulero-Navarro S, Bajolle F, Cobat A, Josowitz R, Itan Y, Quint R, Lorenzo L, Boucherit S, Stoven C, Di Filippo S, Abel L,

- Zhang SY, Bonnet D, Gelb BD, Casanova JL. Autosomal Recessive Cardiomyopathy Presenting as Acute Myocarditis. *J Am Coll Cardiol* 2017;69:1653-65.
65. Schultheiss HP, Kühl U, Cooper LT. The management of myocarditis. *Eur Heart J* 2011;32:2616-25.
66. Kawai C. From myocarditis to cardiomyopathy: mechanisms of inflammation and cell death: learning from the past for the future. *Circulation* 1999;99:1091-100.
67. Godman GC, Bunting H, Melnick JL. The histopathology of Coxsackie virus infection in mice. I. Morphologic observations with four different viral types. *Am J Pathol* 1952;28:223-57.
68. Maekawa Y, Ouzounian M, Opavsky MA, Liu PP. Connecting the missing link between dilated cardiomyopathy and viral myocarditis: virus, cytoskeleton, and innate immunity. *Circulation* 2007;115:5-8.
69. Wilson FM, Miranda QR, Chason JL, Lerner AM. Residual pathologic changes following murine coxsackie A and B myocarditis. *Am J Pathol* 1969;55:253-65.
70. Shioi T, Matsumori A, Sasayama S. Persistent expression of cytokine in the chronic stage of viral myocarditis in mice. *Circulation* 1996;94:2930-7.
71. Seko Y, Takahashi N, Yagita H, Okumura K, Yazaki Y. Expression of cytokine mRNAs in murine hearts with acute myocarditis caused by coxsackievirus b3. *J Pathol* 1997;183:105-8.
72. Seko Y, Shinkai Y, Kawasaki A, Yagita H, Okumura K, Takaku F, Yazaki Y. Expression of perforin in infiltrating cells in murine hearts with acute myocarditis caused by coxsackievirus B3. *Circulation* 1991;84:788-95.
73. Pietras EM, Saha SK, Cheng G. The interferon response to bacterial and viral infections. *J Endotoxin Res* 2006;12:246-50.
74. Woodruff JF, Kilbourne ED. The influence of quantitated post-weaning undernutrition on coxsackievirus B3 infection of adult mice. I. Viral persistence and increased severity of lesions. *J Infect Dis* 1970;121:137-63.
75. Lanier LL. NK cell receptors. *Annu Rev Immunol* 1998;16:359-93.
76. Geissmann F, Jung S, Littman DR. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* 2003;19:71-82.
77. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 2006;124:783-801.
78. Martinez FO, Helming L, Gordon S. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Annu Rev Immunol* 2009;27:451-83.
79. Murray PJ, Wynn TA. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol* 2011;11:723-37.

80. Biswas SK, Mantovani A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nat Immunol* 2010;11:889-96.
81. Takeuch O, Akira S. Epigenetic control of macrophage polarization. *Eur J Immunol* 2011;41:2490-3.
82. Barker RN, Erwig LP, Hill KS, Devine A, Pearce WP, Rees AJ. Antigen presentation by macrophages is enhanced by the uptake of necrotic, but not apoptotic, cells. *Clin Exp Immunol* 2002;127:220-5.
83. Bevan AL, Zhang H, Li Y, Archard LC. Nitric oxide and Coxsackievirus B3 myocarditis: differential expression of inducible nitric oxide synthase in mouse heart after infection with virulent or attenuated virus. *J Med Virol* 2001;64:175-82.
84. Kishimoto C, Kuribayashi K, Masuda T, Tomioka N, Kawai C. Immunologic behavior of lymphocytes in experimental viral myocarditis: significance of T lymphocytes in the severity of myocarditis and silent myocarditis in BALB/c-nu/nu mice. *Circulation* 1985;71:1247-54.
85. Kishimoto C, Kuribayashi K, Fukuma K, Masuda T, Tomioka N, Abelmann WH, Kawai C. Immunologic identification of lymphocyte subsets in experimental murine myocarditis with encephalomyocarditis virus. Different kinetics of lymphocyte subsets between the heart and the peripheral blood, and significance of Thy 1.2+ (pan T) and Lyt 1+, 23+ (immature T) subsets in the development of myocarditis. *Circ Res* 1987;61:715-25.
86. Zinkernagel R. Grundlagen der Immunologie. In: FH K, EC B, RM Z, O H, J E, P D, eds. *Medizinische Mikrobiologie*. 11 ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2005:75-160.
87. Dong C. TH17 cells in development: an updated view of their molecular identity and genetic programming. *Nat Rev Immunol* 2008;8:337-48.
88. Nyland JF, Fairweather D, Shirley DL, Davis SE, Rose NR, Silbergeld EK. Low-dose inorganic mercury increases severity and frequency of chronic coxsackievirus-induced autoimmune myocarditis in mice. *Toxicol Sci* 2012;125:134-43.
89. Vignali DA, Collison LW, Workman CJ. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol* 2008;8:523-32.
90. Tomioka N, Kishimoto C, Matsumori A, Kawai C. Effects of prednisolone on acute viral myocarditis in mice. *J Am Coll Cardiol* 1986;7:868-72.
91. Klingel K, Hohenadl C, Canu A, Albrecht M, Seemann M, Mall G, Kandolf R. Ongoing enterovirus-induced myocarditis is associated with persistent heart muscle infection: quantitative analysis of virus replication, tissue damage, and inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:314-8.
92. Gauntt CJ, Arizpe HM, Higdon AL, Wood HJ, Bowers DF, Rozek MM, Crawley R. Molecular mimicry, anti-coxsackievirus B3 neutralizing monoclonal antibodies, and myocarditis. *J Immunol* 1995;154:2983-95.

93. Maisch B, Bauer E, Cirsi M, Kochsiek K. Cytolytic cross-reactive antibodies directed against the cardiac membrane and viral proteins in coxsackievirus B3 and B4 myocarditis. Characterization and pathogenetic relevance. *Circulation* 1993;87:IV49-IV65.
94. Huber SA. Autoimmunity in myocarditis: relevance of animal models. *Clin Immunol Immunopathol* 1997;83:93-102.
95. Fairweather D, Lawson CM, Chapman AJ, Brown CM, Booth TW, Papadimitriou JM, Shellam GR. Wild isolates of murine cytomegalovirus induce myocarditis and antibodies that cross-react with virus and cardiac myosin. *Immunology* 1998;94:263-70.
96. Huber SA, Lodge PA. Coxsackievirus B-3 myocarditis in Balb/c mice. Evidence for autoimmunity to myocyte antigens. *Am J Pathol* 1984;116:21-9.
97. Richer MJ, Horwitz MS. The innate immune response: an important partner in shaping coxsackievirus-mediated autoimmunity. *J Innate Immun* 2009;1:421-34.
98. Cohn JN, Ferrari R, Sharpe N. Cardiac remodeling--concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling. *J Am Coll Cardiol* 2000;35:569-82.
99. Bauersachs J, Ertl G. Kardiovaskuläres Remodeling. In: Ganten D, Ruckpaul K, Köhrle J, eds. *Molekularmedizinische Grundlagen von para- und autokrinen Regulationsstörungen*. 1 ed. Berlin, Heidelberg: Springer; 2006:335-52.
100. Burchfield JS, Xie M, Hill JA. Pathological ventricular remodeling: mechanisms: part 1 of 2. *Circulation* 2013;128:388-400.
101. Hamacher S, Matern S, Roeb E. [Extracellular matrix -- from basic research to clinical significance. An overview with special consideration of matrix metalloproteinases]. *Dtsch Med Wochenschr* 2004;129:1976-80.
102. Villarreal FJ. *Interstitial Fibrosis in Heart Failure*. 1st ed: Springer-Verlag; 2004.
103. Pauschinger M, Chandrasekharan K, Li J, Schwimmbeck PL, Noutsias M, Schultheiss HP. [Mechanisms of extracellular matrix remodeling in dilated cardiomyopathy]. *Herz* 2002;27:677-82.
104. Bishop JE, Laurent GJ. Collagen turnover and its regulation in the normal and hypertrophying heart. *Eur Heart J* 1995;16 Suppl C:38-44.
105. Billingham ME, Tazelaar HD. The morphological progression of viral myocarditis. *Postgrad Med J* 1986;62:581-4.
106. Weber KT, Brilla CG. Pathological hypertrophy and cardiac interstitium. Fibrosis and renin-angiotensin-aldosterone system. *Circulation* 1991;83:1849-65.
107. Pauschinger M, Knopf D, Petschauer S, Dörner A, Poller W, Schwimmbeck PL, Kühl U, Schultheiss HP. Dilated cardiomyopathy is associated with significant changes in collagen type I/III ratio. *Circulation* 1999;99:2750-6.

108. Verma RP, Hansch C. Matrix metalloproteinases (MMPs): chemical-biological functions and (Q)SARs. *Bioorg Med Chem* 2007;15:2223-68.
109. Yu Q, Stamenkovic I. Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes Dev* 2000;14:163-76.
110. Schonbeck U, Mach F, Libby P. Generation of biologically active IL-1 beta by matrix metalloproteinases: a novel caspase-1-independent pathway of IL-1 beta processing. *J Immunol* 1998;161:3340-6.
111. Mannello F, Luchetti F, Falcieri E, Papa S. Multiple roles of matrix metalloproteinases during apoptosis. *Apoptosis* 2005;10:19-24.
112. Miyamori H, Takino T, Seiki M, Sato H. Human membrane type-2 matrix metalloproteinase is defective in cell-associated activation of progelatinase A. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;267:796-800.
113. Okada Y, Naka K, Kawamura K, Matsumoto T, Nakanishi I, Fujimoto N, Sato H, Seiki M. Localization of matrix metalloproteinase 9 (92-kilodalton gelatinase/type IV collagenase = gelatinase B) in osteoclasts: implications for bone resorption. *Lab Invest* 1995;72:311-22.
114. Woodiwiss AJ, Tsoetsi OJ, Sprott S, Lancaster EJ, Mela T, Chung ES, Meyer TE, Norton GR. Reduction in myocardial collagen cross-linking parallels left ventricular dilatation in rat models of systolic chamber dysfunction. *Circulation* 2001;103:155-60.
115. Kim HE, Dalal SS, Young E, Legato MJ, Weisfeldt ML, D'Armiento J. Disruption of the myocardial extracellular matrix leads to cardiac dysfunction. *J Clin Invest* 2000;106:857-66.
116. Brew K, Dinakarpandian D, Nagase H. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta* 2000;1477:267-83.
117. Cawston TE, Curry VA, Clark IM, Hazleman BL. Identification of a new metalloproteinase inhibitor that forms tight-binding complexes with collagenase. *Biochem J* 1990;269:183-7.
118. Denhardt DT, Feng B, Edwards DR, Cocuzzi ET, Malyankar UM. Tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP, aka EPA): structure, control of expression and biological functions. *Pharmacol Ther* 1993;59:329-41.
119. Pauschinger M, Chandrasekharan K, Schultheiss HP. Myocardial remodeling in viral heart disease: possible interactions between inflammatory mediators and MMP-TIMP system. *Heart Fail Rev* 2004;9:21-31.
120. Li J, Schwimmbeck PL, Tschöpe C, Leschka S, Husmann L, Rutschow S, Reichenbach F, Noutsias M, Kobalz U, Poller W, Spillmann F, Zeichhardt H, Schultheiss HP, Pauschinger M. Collagen degradation in a murine myocarditis model: relevance of matrix metalloproteinase in association with inflammatory induction. *Cardiovasc Res* 2002;56:235-47.

121. Rouet-Benzineb P, Buhler JM, Dreyfus P, Delcourt A, Dorent R, Perennec J, Crozatier B, Harf A, Lafuma C. Altered balance between matrix gelatinases (MMP-2 and MMP-9) and their tissue inhibitors in human dilated cardiomyopathy: potential role of MMP-9 in myosin-heavy chain degradation. *Eur J Heart Fail* 1999;1:337-52.
122. Sivasubramanian N, Coker ML, Kurrelmeyer KM, MacLellan WR, DeMayo FJ, Spinale FG, Mann DL. Left ventricular remodeling in transgenic mice with cardiac restricted overexpression of tumor necrosis factor. *Circulation* 2001;104:826-31.
123. Kawamura N, Kubota T, Kawano S, Monden Y, Feldman AM, Tsutsui H, Takeshita A, Sunagawa K. Blockade of NF-kappaB improves cardiac function and survival without affecting inflammation in TNF-alpha-induced cardiomyopathy. *Cardiovasc Res* 2005;66:520-9.
124. Siwik DA, Chang DL, Colucci WS. Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha decrease collagen synthesis and increase matrix metalloproteinase activity in cardiac fibroblasts in vitro. *Circ Res* 2000;86:1259-65.
125. Xie Z, Singh M, Siwik DA, Joyner WL, Singh K. Osteopontin inhibits interleukin-1beta-stimulated increases in matrix metalloproteinase activity in adult rat cardiac fibroblasts: role of protein kinase C-zeta. *J Biol Chem* 2003;278:48546-52.
126. Uria JA, Jimenez MG, Balbin M, Freije JM, Lopez-Otin C. Differential effects of transforming growth factor-beta on the expression of collagenase-1 and collagenase-3 in human fibroblasts. *J Biol Chem* 1998;273:9769-77.
127. Browatzki M, Larsen D, Pfeiffer CA, Gehrke SG, Schmidt J, Kranzhofer A, Katus HA, Kranzhofer R. Angiotensin II stimulates matrix metalloproteinase secretion in human vascular smooth muscle cells via nuclear factor-kappaB and activator protein 1 in a redox-sensitive manner. *J Vasc Res* 2005;42:415-23.
128. Jesmin S, Sakuma I, Hattori Y, Kitabatake A. Role of angiotensin II in altered expression of molecules responsible for coronary matrix remodeling in insulin-resistant diabetic rats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:2021-6.
129. Coker ML, Jolly JR, Joffs C, Etoh T, Holder JR, Bond BR, Spinale FG. Matrix metalloproteinase expression and activity in isolated myocytes after neurohormonal stimulation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001;281:H543-H51.
130. Naito S, Shimizu S, Matsuu M, Nakashima M, Nakayama T, Yamashita S, Sekine I. Ets-1 upregulates matrix metalloproteinase-1 expression through extracellular matrix adhesion in vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;291:130-8.
131. Briest W, Ressler B, Deten A, Zimmer HG. Norepinephrine-induced cardiac hypertrophy and fibrosis are not due to mast cell degranulation. *Mol Cell Biochem* 2003;252:229-37.
132. Zaragoza C, Soria E, Lopez E, Browning D, Balbin M, Lopez-Otin C, Lamas S. Activation of the mitogen activated protein kinase extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 by the nitric oxide-cGMP-cGMP-dependent protein kinase axis regulates the expression of matrix metalloproteinase 13 in vascular endothelial cells. *Mol Pharmacol* 2002;62:927-35.

133. Deschner J, Rath-Deschner B, Agarwal S. Regulation of matrix metalloproteinase expression by dynamic tensile strain in rat fibrochondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 2006;14:264-72.
134. Remacle AG, Chekanov AV, Golubkov VS, Savinov AY, Rozanov DV, Strongin AY. O-glycosylation regulates autolysis of cellular membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP). *J Biol Chem* 2006;281:16897-905.
135. HE CS, Wilhelm SM, Pentland AP, Marmer BL, Grant GA, Eisen AZ, Goldberg GI. Tissue cooperation in a proteolytic cascade activating human interstitial collagenase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86:2632-6.
136. Piacentini L, Gray M, Honbo NY, Chentoufi J, Bergman M, Karliner JS. Endothelin-1 stimulates cardiac fibroblast proliferation through activation of protein kinase C. *J Mol Cell Cardiol* 2000;32:565-76.
137. Teerlink JR. Reversal of left ventricular remodeling: role of the endothelin pathway. *J Card Fail* 2002;8:S494-S9.
138. Barth W, Deten A, Bauer M, Reinohs M, Leicht M, Zimmer HG. Differential remodeling of the left and right heart after norepinephrine treatment in rats: studies on cytokines and collagen. *J Mol Cell Cardiol* 2000;32:273-84.
139. Briest W, Holzl A, Rassler B, Deten A, Leicht M, Baba HA, Zimmer HG. Cardiac remodeling after long term norepinephrine treatment in rats. *Cardiovasc Res* 2001;52:265-73.
140. Wang D, Gladysheva IP, Fan TH, Sullivan R, Houg AK, Reed GL. Atrial natriuretic peptide affects cardiac remodeling, function, heart failure, and survival in a mouse model of dilated cardiomyopathy. *Hypertension* 2014;63:514-9.
141. Brilla CG, Matsubara LS, Weber KT. Anti-aldosterone treatment and the prevention of myocardial fibrosis in primary and secondary hyperaldosteronism. *J Mol Cell Cardiol* 1993;25:563-75.
142. Brilla CG, Pick R, Tan LB, Janicki JS, Weber KT. Remodeling of the rat right and left ventricles in experimental hypertension. *Circ Res* 1990;67:1355-64.
143. Hirsch AT, Talsness CE, Schunkert H, Paul M, Dzau VJ. Tissue-specific activation of cardiac angiotensin converting enzyme in experimental heart failure. *Circ Res* 1991;69:475-82.
144. Schunkert H, Dzau VJ, Tang SS, Hirsch AT, Apstein CS, Lorell BH. Increased rat cardiac angiotensin converting enzyme activity and mRNA expression in pressure overload left ventricular hypertrophy. Effects on coronary resistance, contractility, and relaxation. *J Clin Invest* 1990;86:1913-20.
145. Falkenhahn M, Franke F, Bohle RM, Zhu YC, Stauss HM, Bachmann S, Danilov S, Unger T. Cellular distribution of angiotensin-converting enzyme after myocardial infarction. *Hypertension* 1995;25:219-26.

146. Weinberg EO, Schoen FJ, George D, Kagaya Y, Douglas PS, Litwin SE, Schunkert H, Benedict CR, Lorell BH. Angiotensin-converting enzyme inhibition prolongs survival and modifies the transition to heart failure in rats with pressure overload hypertrophy due to ascending aortic stenosis. *Circulation* 1994;90:1410-22.
147. St John Sutton M, Pfeffer MA, Plappert T, Rouleau JL, Moye LA, Dagenais GR, Lamas GA, Klein M, Sussex B, Goldman S, . Quantitative two-dimensional echocardiographic measurements are major predictors of adverse cardiovascular events after acute myocardial infarction. The protective effects of captopril. *Circulation* 1994;89:68-75.
148. Baker KM, Aceto JF. Angiotensin II stimulation of protein synthesis and cell growth in chick heart cells. *Am J Physiol* 1990;259:H610-H8.
149. Schorb W, Booz GW, Dostal DE, Conrad KM, Chang KC, Baker KM. Angiotensin II is mitogenic in neonatal rat cardiac fibroblasts. *Circ Res* 1993;72:1245-54.
150. Brilla CG, Weber KT. Reactive and reparative myocardial fibrosis in arterial hypertension in the rat. *Cardiovasc Res* 1992;26:671-7.
151. Young MJ, Funder JW. The renin-angiotensin-aldosterone system in experimental mineralocorticoid-salt-induced cardiac fibrosis. *Am J Physiol* 1996;271:E883-E8.
152. Le Menuet D, Isnard R, Bichara M, Viengchareun S, Muffat-Joly M, Walker F, Zennaro MC, Lombes M. Alteration of cardiac and renal functions in transgenic mice overexpressing human mineralocorticoid receptor. *J Biol Chem* 2001;276:38911-20.
153. Qin W, Rudolph AE, Bond BR, Rocha R, Blomme EA, Goellner JJ, Funder JW, McMahon EG. Transgenic model of aldosterone-driven cardiac hypertrophy and heart failure. *Circ Res* 2003;93:69-76.
154. Young MJ, Moussa L, Dilley R, Funder JW. Early inflammatory responses in experimental cardiac hypertrophy and fibrosis: effects of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase inactivation. *Endocrinology* 2003;144:1121-5.
155. Rocha R, Rudolph AE, Friedrich GE, Nachowiak DA, Kekec BK, Blomme EA, McMahon EG, Delyani JA. Aldosterone induces a vascular inflammatory phenotype in the rat heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002;283:H1802-H10.
156. Young M, Funder JW. Eplerenone, but not steroid withdrawal, reverses cardiac fibrosis in deoxycorticosterone/salt-treated rats. *Endocrinology* 2004;145:3153-7.
157. Yoshida K, Kim-Mitsuyama S, Wake R, Izumiya Y, Izumi Y, Yukimura T, Ueda M, Yoshiyama M, Iwao H. Excess aldosterone under normal salt diet induces cardiac hypertrophy and infiltration via oxidative stress. *Hypertens Res* 2005;28:447-55.
158. Callera GE, Touyz RM, Tostes RC, Yogi A, He Y, Malkinson S, Schiffrin EL. Aldosterone activates vascular p38MAP kinase and NADPH oxidase via c-Src. *Hypertension* 2005;45:773-9.

159. Fejes-Toth G, Pearce D, Naray-Fejes-Toth A. Subcellular localization of mineralocorticoid receptors in living cells: effects of receptor agonists and antagonists. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:2973-8.
160. Derfoul A, Robertson NM, Lingrel JB, Hall DJ, Litwack G. Regulation of the human Na/K-ATPase beta1 gene promoter by mineralocorticoid and glucocorticoid receptors. *J Biol Chem* 1998;273:20702-11.
161. Funder JW. The nongenomic actions of aldosterone. *Endocr Rev* 2005;26:313-21.
162. Mihailidou AS, Funder JW. Nongenomic effects of mineralocorticoid receptor activation in the cardiovascular system. *Steroids* 2005;70:347-51.
163. Cardona A, Baker P, Kahwash R, Smart S, Phay JE, Basso C, Raman SV. Evidence of aldosterone synthesis in human myocardium in acute myocarditis. *Int J Cardiol* 2018.
164. Brilla CG, Matsubara LS, Weber KT. Antifibrotic effects of spironolactone in preventing myocardial fibrosis in systemic arterial hypertension. *Am J Cardiol* 1993;71:12A-6A.
165. Pitt B, Zannad F, Remme WJ, Cody R, Castaigne A, Perez A, Palensky J, Wittes J. The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med* 1999;341:709-17.
166. Zannad F, Alla F, Dousset B, Perez A, Pitt B. Limitation of excessive extracellular matrix turnover may contribute to survival benefit of spironolactone therapy in patients with congestive heart failure: insights from the randomized aldactone evaluation study (RALES). Rales Investigators. *Circulation* 2000;102:2700-6.
167. Lainscak M, Pelliccia F, Rosano G, Vitale C, Schiariti M, Greco C, Speziale G, Gaudio C. Safety profile of mineralocorticoid receptor antagonists: Spironolactone and eplerenone. *Int J Cardiol* 2015;200:25-9.
168. Pitt B, Remme W, Zannad F, Neaton J, Martinez F, Roniker B, Bittman R, Hurley S, Kleiman J, Gatlin M. Eplerenone, a selective aldosterone blocker, in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. *N Engl J Med* 2003;348:1309-21.
169. Zannad F, McMurray JJ, Krum H, van Veldhuisen DJ, Swedberg K, Shi H, Vincent J, Pocock SJ, Pitt B. Eplerenone in patients with systolic heart failure and mild symptoms. *N Engl J Med* 2011;364:11-21.
170. Montalescot G, Pitt B, Lopez de SE, Hamm CW, Flather M, Verheugt F, Shi H, Turgonyi E, Orri M, Vincent J, Zannad F. Early eplerenone treatment in patients with acute ST-elevation myocardial infarction without heart failure: the Randomized Double-Blind Reminder Study. *Eur Heart J* 2014;35:2295-302.
171. O'Connell JB, Dec GW, Goldenberg IF, Starling RC, Mudge GH, Augustine SM, Costanzo-Nordin MR, Hess ML, Hosenpud JD, Icenogle TB, . Results of heart transplantation for active lymphocytic myocarditis. *J Heart Transplant* 1990;9:351-5.

172. Moloney ED, Egan JJ, Kelly P, Wood AE, Cooper LT, Jr. Transplantation for myocarditis: a controversy revisited. *J Heart Lung Transplant* 2005;24:1103-10.
173. Institute of Laboratory Animal Resources (U.S.). Committee on Revision of the Guide for Laboratory Animals Facilities and Care., Institute of Laboratory Animal Resources (U.S.). Committee on the Guide for Laboratory Animal Facilities and Care., Animal Care Panel (U.S.). Animal Facilities Standards Committee. Guide for laboratory animal facilities and care. Publication / Public Health Service. 7th ed. Bethesda, Md.: U.S. Public Health Service : For sale by the Supt. of Docs.; 1996.
174. Baan J, van der Velde ET, de Bruin HG, Smeenk GJ, Koops J, van Dijk AD, Temmerman D, Senden J, Buis B. Continuous measurement of left ventricular volume in animals and humans by conductance catheter. *Circulation* 1984;70:812-23.
175. Steendijk P, Staal E, Jukema JW, Baan J. Hypertonic saline method accurately determines parallel conductance for dual-field conductance catheter. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001;281:H755-H63.
176. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;162:156-9.
177. Chomczynski P. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques* 1993;15:532-7.
178. Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y)* 1993;11:1026-30.
179. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985;230:1350-4.
180. Noutsias M, Rohde M, Block A, Klippert K, Lettau O, Blunert K, Hummel M, Kühl U, Lehmkuhl H, Hetzer R, Rauch U, Poller W, Pauschinger M, Schultheiss HP, Volk HD, Kotsch K. Preamplification techniques for real-time RT-PCR analyses of endomyocardial biopsies. *BMC Mol Biol* 2008;9:3.
181. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-75.
182. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 1985;150:76-85.
183. Kleiner DE, Stetler-Stevenson WG. Quantitative zymography: detection of picogram quantities of gelatinases. *Anal Biochem* 1994;218:325-9.
184. Junqueira LC, Cossermelli W, Brentani R. Differential staining of collagens type I, II and III by Sirius Red and polarization microscopy. *Arch Histol Jpn* 1978;41:267-74.
185. Whittaker P, Kloner RA, Boughner DR, Pickering JG. Quantitative assessment of myocardial collagen with picosirius red staining and circularly polarized light. *Basic Res Cardiol* 1994;89:397-410.

186. Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 1992;119:493-501.
187. Coons A, Creech H, Jones R. Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group. *Proc Soc Exp Biol Med* 1941;47:200-2.
188. Coons AH, Leduc EH, Connolly JM. Studies on antibody production. I. A method for the histochemical demonstration of specific antibody and its application to a study of the hyperimmune rabbit. *J Exp Med* 1955;102:49-60.
189. Petersen K, Pedersen HC. Chapter 6 - Detection Methods. In: Taylor CR, Rudbeck L, eds. *IHC Guidebook - Immunohistochemical Staining Methods*. 6th Edition ed: Dako; 2013:80-1.
190. Zhang H, Yousef GE, Ouyang X, Archard LC. Characterization of a murine model of myocarditis induced by a reactivated coxsackievirus B3. *Int J Exp Pathol* 1994;75:99-110.
191. Nishio R, Sasayama S, Matsumori A. Left ventricular pressure-volume relationship in a murine model of congestive heart failure due to acute viral myocarditis. *J Am Coll Cardiol* 2002;40:1506-14.
192. Xiao J, Shimada M, Liu W, Hu D, Matsumori A. Anti-inflammatory effects of eplerenone on viral myocarditis. *Eur J Heart Fail* 2009;11:349-53.
193. Hashimoto I. Myocarditis in mice infected with Coxsackie virus B3. *Br J Exp Pathol* 1986;67:737-45.
194. 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;312:885-90.
195. Rutschow S, Leschka S, Westermann D, Puhl K, Weitz A, Ladyszenski L, Jäger S, Zeichhardt H, Noutsias M, Schultheiss HP, Tschöpe C, Pauschinger M. Left ventricular enlargement in coxsackievirus-B3 induced chronic myocarditis--ongoing inflammation and an imbalance of the matrix degrading system. *Eur J Pharmacol* 2010;630:145-51.
196. Tschöpe C, Westermann D, Steendijk P, Noutsias M, Rutschow S, Weitz A, Schwimmbeck PL, Schultheiss HP, Pauschinger M. Hemodynamic characterization of left ventricular function in experimental coxsackieviral myocarditis: effects of carvedilol and metoprolol. *Eur J Pharmacol* 2004;491:173-9.
197. Brady AJ, Poole-Wilson PA, Harding SE, Warren JB. Nitric oxide production within cardiac myocytes reduces their contractility in endotoxemia. *Am J Physiol* 1992;263:H1963-6.
198. Kuster GM, Kotlyar E, Rude MK, Siwik DA, Liao R, Colucci WS, Sam F. Mineralocorticoid receptor inhibition ameliorates the transition to myocardial failure and decreases oxidative stress and inflammation in mice with chronic pressure overload. *Circulation* 2005;111:420-7.

199. Wahed MI, Watanabe K, Ma M, Yamaguchi K, Takahashi T, Tachikawa H, Kodama M, Aizawa Y. Effects of eplerenone, a selective aldosterone blocker, on the progression of left ventricular dysfunction and remodeling in rats with dilated cardiomyopathy. *Pharmacology* 2005;73:81-8.
200. Dietz R, Lang RE, Purgaj J, Merkel A, Schomig A, Kubler W. Relationships between haemodynamic parameters and concentrations of atrial natriuretic peptide in human plasma. *J Hypertens Suppl* 1986;4:S512-S5.
201. Seko Y, Shinkai Y, Kawasaki A, Yagita H, Okumura K, Yazaki Y. Evidence of perforin-mediated cardiac myocyte injury in acute murine myocarditis caused by Coxsackie virus B3. *J Pathol* 1993;170:53-8.
202. Torre-Amione G, Kapadia S, Lee J, Bies RD, Lebovitz R, Mann DL. Expression and functional significance of tumor necrosis factor receptors in human myocardium. *Circulation* 1995;92:1487-93.
203. Henke A, Huber S, Stelzner A, Whitton JL. The role of CD8+ T lymphocytes in coxsackievirus B3-induced myocarditis. *J Virol* 1995;69:6720-8.
204. Caforio AL, Mahon NJ, Tona F, McKenna WJ. Circulating cardiac autoantibodies in dilated cardiomyopathy and myocarditis: pathogenetic and clinical significance. *Eur J Heart Fail* 2002;4:411-7.
205. Kallwellis-Opara A, Dörner A, Poller WC, Noutsias M, Kühl U, Schultheiss HP, Pauschinger M. Autoimmunological features in inflammatory cardiomyopathy. *Clin Res Cardiol* 2007;96:469-80.
206. Arstall MA, Sawyer DB, Fukazawa R, Kelly RA. Cytokine-mediated apoptosis in cardiac myocytes: the role of inducible nitric oxide synthase induction and peroxynitrite generation. *Circ Res* 1999;85:829-40.
207. Fairweather D, Rose NR. Inflammatory heart disease: a role for cytokines. *Lupus* 2005;14:646-51.
208. Chen D, Assad-Kottner C, Orrego C, Torre-Amione G. Cytokines and acute heart failure. *Crit Care Med* 2008;36:S9-16.
209. Neumann DA, Lane JR, Allen GS, Herskowitz A, Rose NR. Viral myocarditis leading to cardiomyopathy: do cytokines contribute to pathogenesis? *Clin Immunol Immunopathol* 1993;68:181-90.
210. Seko Y, Yagita H, Okumura K, Yazaki Y. Expression of vascular cell adhesion molecule-1 in murine hearts with acute myocarditis caused by coxsackievirus B3. *J Pathol* 1996;180:450-4.
211. Cavender D, Saegusa Y, Ziff M. Stimulation of endothelial cell binding of lymphocytes by tumor necrosis factor. *J Immunol* 1987;139:1855-60.
212. Osborn L, Hession C, Tizard R, Vassallo C, Lühowskyj S, Chi-Rosso G, Lobb R. Direct expression cloning of vascular cell adhesion molecule 1, a cytokine-induced endothelial protein that binds to lymphocytes. *Cell* 1989;59:1203-11.

213. Seko Y, Matsuda H, Kato K, Hashimoto Y, Yagita H, Okumura K, Yazaki Y. Expression of intercellular adhesion molecule-1 in murine hearts with acute myocarditis caused by coxsackievirus B3. *J Clin Invest* 1993;91:1327-36.
214. Seko Y, Ishiyama S, Nishikawa T, Kasajima T, Hiroe M, Kagawa N, Osada K, Suzuki S, Yagita H, Okumura K, . Restricted usage of T cell receptor V alpha-V beta genes in infiltrating cells in the hearts of patients with acute myocarditis and dilated cardiomyopathy. *J Clin Invest* 1995;96:1035-41.
215. Granger DN, Vowinkel T, Petnehazy T. Modulation of the inflammatory response in cardiovascular disease. *Hypertension* 2004;43:924-31.
216. Lindahl P, Gresser I, Leary P, Tovey M. Enhanced expression of histocompatibility antigens of lymphoid cells in mice treated with interferon. *J Infect Dis* 1976;133 Suppl:A66-A8.
217. Godeny EK, Gauntt CJ. Involvement of natural killer cells in coxsackievirus B3-induced murine myocarditis. *J Immunol* 1986;137:1695-702.
218. Godeny EK, Gauntt CJ. Murine natural killer cells limit coxsackievirus B3 replication. *J Immunol* 1987;139:913-8.
219. Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, Weaver CT. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol* 2005;6:1123-32.
220. Li J, Leschka S, Rutschow S, Schwimmbeck PL, Husmann L, Noutsias M, Westermann D, Poller W, Zeichhardt H, Klingel K, Tschöpe C, Schultheiss HP, Pauschinger M. Immunomodulation by interleukin-4 suppresses matrix metalloproteinases and improves cardiac function in murine myocarditis. *Eur J Pharmacol* 2007;554:60-8.
221. Munoz-Pacheco P, Ortega-Hernandez A, Caro-Vadillo A, Casanueva-Eliceiry S, Aragoncillo P, Egido J, Fernandez-Cruz A, Gomez-Garre D. Eplerenone enhances cardioprotective effects of standard heart failure therapy through matricellular proteins in hypertensive heart failure. *J Hypertens* 2013;31:2309-18.
222. Fujiu K, Wang J, Nagai R. Cardioprotective function of cardiac macrophages. *Cardiovasc Res* 2014;102:232-9.
223. Usher MG, Duan SZ, Ivaschenko CY, Frieler RA, Berger S, Schutz G, Lumeng CN, Mortensen RM. Myeloid mineralocorticoid receptor controls macrophage polarization and cardiovascular hypertrophy and remodeling in mice. *J Clin Invest* 2010;120:3350-64.
224. Hickstein DD, Ozols J, Williams SA, Baenziger JU, Locksley RM, Roth GJ. Isolation and characterization of the receptor on human neutrophils that mediates cellular adherence. *J Biol Chem* 1987;262:5576-80.
225. Rivadeneyra L, Charo N, Kviatcovsky D, de la Barrera S, Gomez RM, Schattner M. Role of neutrophils in CVB3 infection and viral myocarditis. *J Mol Cell Cardiol* 2018;125:149-61.

226. Epelman S, Liu PP, Mann DL. Role of innate and adaptive immune mechanisms in cardiac injury and repair. *Nat Rev Immunol* 2015;15:117-29.
227. Huang LL, Nikolic-Paterson DJ, Han Y, Ozols E, Ma FY, Young MJ, Tesch GH. Myeloid mineralocorticoid receptor activation contributes to progressive kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2014;25:2231-40.
228. Zaragoza C, Ocampo CJ, Saura M, McMillan A, Lowenstein CJ. Nitric oxide inhibition of coxsackievirus replication in vitro. *J Clin Invest* 1997;100:1760-7.
229. Bonfoco E, Krainc D, Ankarcrona M, Nicotera P, Lipton SA. Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:7162-6.
230. Siwik DA, Pagano PJ, Colucci WS. Oxidative stress regulates collagen synthesis and matrix metalloproteinase activity in cardiac fibroblasts. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001;280:C53-60.
231. Ding AH, Nathan CF, Stuehr DJ. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *J Immunol* 1988;141:2407-12.
232. Ishiyama S, Hiroe M, Nishikawa T, Abe S, Shimojo T, Ito H, Ozasa S, Yamakawa K, Matsuzaki M, Mohammed MU, Nakazawa H, Kasajima T, Marumo F. Nitric oxide contributes to the progression of myocardial damage in experimental autoimmune myocarditis in rats. *Circulation* 1997;95:489-96.
233. Mantovani A, Sica A, Locati M. Macrophage polarization comes of age. *Immunity* 2005;23:344-6.
234. Carthy CM, Granville DJ, Watson KA, Anderson DR, Wilson JE, Yang D, Hunt DW, McManus BM. Caspase activation and specific cleavage of substrates after coxsackievirus B3-induced cytopathic effect in HeLa cells. *J Virol* 1998;72:7669-75.
235. Luo H, Yanagawa B, Zhang J, Luo Z, Zhang M, Esfandiarei M, Carthy C, Wilson JE, Yang D, McManus BM. Coxsackievirus B3 replication is reduced by inhibition of the extracellular signal-regulated kinase (ERK) signaling pathway. *J Virol* 2002;76:3365-73.
236. Teodoro JG, Branton PE. Regulation of apoptosis by viral gene products. *J Virol* 1997;71:1739-46.
237. Huber SA. T cells expressing the gamma delta T cell receptor induce apoptosis in cardiac myocytes. *Cardiovasc Res* 2000;45:579-87.
238. Colston JT, Chandrasekar B, Freeman GL. Expression of apoptosis-related proteins in experimental coxsackievirus myocarditis. *Cardiovasc Res* 1998;38:158-68.
239. Ebermann L, Wika S, Klumpe I, Hammer E, Klingel K, Lassner D, Volker U, Erben U, Zeichhardt H, Schultheiss HP, Dörner A. The mitochondrial respiratory chain

has a critical role in the antiviral process in Coxsackievirus B3-induced myocarditis. *Lab Invest* 2012;92:125-34.

240. Schaper J, Speiser B. The extracellular matrix in the failing human heart. *Basic Res Cardiol* 1992;87 Suppl 1:303-9.

241. Spinale FG. Myocardial matrix remodeling and the matrix metalloproteinases: influence on cardiac form and function. *Physiol Rev* 2007;87:1285-342.

242. Jaffre F, Friedman AE, Hu Z, Mackman N, Blaxall BC. beta-adrenergic receptor stimulation transactivates protease-activated receptor 1 via matrix metalloproteinase 13 in cardiac cells. *Circulation* 2012;125:2993-3003.

243. Westermann D, Savvatis K, Schultheiss HP, Tschöpe C. Immunomodulation and matrix metalloproteinases in viral myocarditis. *J Mol Cell Cardiol* 2010;48:468-73.

244. Cheung C, Luo H, Yanagawa B, Leong HS, Samarasekera D, Lai JC, Suarez A, Zhang J, McManus BM. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in coxsackievirus-induced myocarditis. *Cardiovasc Pathol* 2006;15:63-74.

245. Li H, Simon H, Bocan TM, Peterson JT. MMP/TIMP expression in spontaneously hypertensive heart failure rats: the effect of ACE- and MMP-inhibition. *Cardiovasc Res* 2000;46:298-306.

246. Thomas CV, Coker ML, Zellner JL, Handy JR, Crumbley AJ, III, Spinale FG. Increased matrix metalloproteinase activity and selective upregulation in LV myocardium from patients with end-stage dilated cardiomyopathy. *Circulation* 1998;97:1708-15.

247. Spinale FG, Coker ML, Heung LJ, Bond BR, Gunasinghe HR, Etoh T, Goldberg AT, Zellner JL, Crumbley AJ. A matrix metalloproteinase induction/activation system exists in the human left ventricular myocardium and is upregulated in heart failure. *Circulation* 2000;102:1944-9.

248. Polyakova V, Loeffler I, Hein S, Miyagawa S, Piotrowska I, Dammer S, Risteli J, Schaper J, Kostin S. Fibrosis in endstage human heart failure: severe changes in collagen metabolism and MMP/TIMP profiles. *Int J Cardiol* 2011;151:18-33.

249. Marchant DJ, Bellac CL, Moraes TJ, Wadsworth SJ, Dufour A, Butler GS, Bilawchuk LM, Hendry RG, Robertson AG, Cheung CT, Ng J, Ang L, Luo Z, Heilbron K, Norris MJ, Duan W, Bucyk T, Karpov A, Devel L, Georgiadis D, Hegele RG, Luo H, Granville DJ, Dive V, McManus BM, Overall CM. A new transcriptional role for matrix metalloproteinase-12 in antiviral immunity. *Nat Med* 2014;20:493-502.

250. Shapiro SD. Diverse roles of macrophage matrix metalloproteinases in tissue destruction and tumor growth. *Thromb Haemost* 1999;82:846-9.

251. Crocker SJ, Frausto RF, Whitmire JK, Benning N, Milner R, Whitton JL. Amelioration of coxsackievirus B3-mediated myocarditis by inhibition of tissue inhibitors of matrix metalloproteinase-1. *Am J Pathol* 2007;171:1762-73.

252. Edwards DR, Murphy G, Reynolds JJ, Whitham SE, Docherty AJ, Angel P, Heath JK. Transforming growth factor beta modulates the expression of collagenase and metalloproteinase inhibitor. *EMBO J* 1987;6:1899-904.
253. Wahl SM, Allen JB, Weeks BS, Wong HL, Klotman PE. Transforming growth factor beta enhances integrin expression and type IV collagenase secretion in human monocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:4577-81.
254. Knauper V, Lopez-Otin C, Smith B, Knight G, Murphy G. Biochemical characterization of human collagenase-3. *J Biol Chem* 1996;271:1544-50.
255. Aimes RT, Quigley JP. Matrix metalloproteinase-2 is an interstitial collagenase. Inhibitor-free enzyme catalyzes the cleavage of collagen fibrils and soluble native type I collagen generating the specific 3/4- and 1/4-length fragments. *J Biol Chem* 1995;270:5872-6.
256. Sawicki G, Leon H, Sawicka J, Sariahmetoglu M, Schulze CJ, Scott PG, Szczesna-Cordary D, Schulz R. Degradation of myosin light chain in isolated rat hearts subjected to ischemia-reperfusion injury: a new intracellular target for matrix metalloproteinase-2. *Circulation* 2005;112:544-52.
257. Wang W, Schulze CJ, Suarez-Pinzon WL, Dyck JR, Sawicki G, Schulz R. Intracellular action of matrix metalloproteinase-2 accounts for acute myocardial ischemia and reperfusion injury. *Circulation* 2002;106:1543-9.
258. Shipley JM, Wesselschmidt RL, Kobayashi DK, Ley TJ, Shapiro SD. Metalloelastase is required for macrophage-mediated proteolysis and matrix invasion in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:3942-6.
259. Murphy G, Cockett MI, Stephens PE, Smith BJ, Docherty AJ. Stromelysin is an activator of procollagenase. A study with natural and recombinant enzymes. *Biochem J* 1987;248:265-8.
260. Ogata Y, Enghild JJ, Nagase H. Matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) activates the precursor for the human matrix metalloproteinase 9. *J Biol Chem* 1992;267:3581-4.
261. Arza B, Hoylaerts MF, Felez J, Collen D, Lijnen HR. Prostromelysin-1 (proMMP-3) stimulates plasminogen activation by tissue-type plasminogen activator. *Eur J Biochem* 2000;267:6378-84.
262. Fraccarollo D, Galuppo P, Hildemann S, Christ M, Ertl G, Bauersachs J. Additive improvement of left ventricular remodeling and neurohormonal activation by aldosterone receptor blockade with eplerenone and ACE inhibition in rats with myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2003;42:1666-73.
263. Rastogi S, Mishra S, Zaca V, Alesh I, Gupta RC, Goldstein S, Sabbah HN. Effect of long-term monotherapy with the aldosterone receptor blocker eplerenone on cytoskeletal proteins and matrix metalloproteinases in dogs with heart failure. *Cardiovasc Drugs Ther* 2007;21:415-22.

264. Chi JF, Uzui H, Guo HY, Ueda T, Lee JD. Effects of eplerenone on the activation of matrix metalloproteinase-2 stimulated by high glucose and interleukin-1beta in human cardiac fibroblasts. *Genet Mol Res* 2014;13:4845-55.
265. Pauschinger M, Rutschow S, Chandrasekharan K, Westermann D, Weitz A, Peter SL, Zeichhardt H, Poller W, Noutsias M, Li J, Schultheiss HP, Tschöpe C. Carvedilol improves left ventricular function in murine coxsackievirus-induced acute myocarditis association with reduced myocardial interleukin-1beta and MMP-8 expression and a modulated immune response. *Eur J Heart Fail* 2005;7:444-52.
266. Shingu M, Nagai Y, Isayama T, Naono T, Nobunaga M, Nagai Y. The effects of cytokines on metalloproteinase inhibitors (TIMP) and collagenase production by human chondrocytes and TIMP production by synovial cells and endothelial cells. *Clin Exp Immunol* 1993;94:145-9.
267. Weber KT. Cardiac interstitium in health and disease: the fibrillar collagen network. *J Am Coll Cardiol* 1989;13:1637-52.
268. Lang C, Sauter M, Szalay G, Racchi G, Grassi G, Rainaldi G, Mercatanti A, Lang F, Kandolf R, Klingel K. Connective tissue growth factor: a crucial cytokine-mediating cardiac fibrosis in ongoing enterovirus myocarditis. *J Mol Med (Berl)* 2008;86:49-60.
269. Hanawa H, Abe S, Hayashi M, Yoshida T, Yoshida K, Shiono T, Fuse K, Ito M, Tachikawa H, Kashimura T, Okura Y, Kato K, Kodama M, Maruyama S, Yamamoto T, Aizawa Y. Time course of gene expression in rat experimental autoimmune myocarditis. *Clin Sci (Lond)* 2002;103:623-32.
270. Marijjanowski MM, Teeling P, Mann J, Becker AE. Dilated cardiomyopathy is associated with an increase in the type I/type III collagen ratio: a quantitative assessment. *J Am Coll Cardiol* 1995;25:1263-72.
271. Carver W, Nagpal ML, Nachtigal M, Borg TK, Terracio L. Collagen expression in mechanically stimulated cardiac fibroblasts. *Circ Res* 1991;69:116-22.
272. Ignatz RA, Massague J. Transforming growth factor-beta stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix. *J Biol Chem* 1986;261:4337-45.
273. Nagai Y, Miyata K, Sun GP, Rahman M, Kimura S, Miyatake A, Kiyomoto H, Kohno M, Abe Y, Yoshizumi M, Nishiyama A. Aldosterone stimulates collagen gene expression and synthesis via activation of ERK1/2 in rat renal fibroblasts. *Hypertension* 2005;46:1039-45.
274. Leask A. Getting to the heart of the matter: new insights into cardiac fibrosis. *Circ Res* 2015;116:1269-76.
275. Koitabashi N, Arai M, Kogure S, Niwano K, Watanabe A, Aoki Y, Maeno T, Nishida T, Kubota S, Takigawa M, Kurabayashi M. Increased connective tissue growth factor relative to brain natriuretic peptide as a determinant of myocardial fibrosis. *Hypertension* 2007;49:1120-7.

276. Panek AN, Posch MG, Alenina N, Ghadge SK, Erdmann B, Popova E, Perrot A, Geier C, Dietz R, Morano I, Bader M, Ozcelik C. Connective tissue growth factor overexpression in cardiomyocytes promotes cardiac hypertrophy and protection against pressure overload. *PLoS One* 2009;4:e6743.
277. Wang Q, Usinger W, Nichols B, Gray J, Xu L, Seeley TW, Brenner M, Guo G, Zhang W, Oliver N, Lin A, Yeowell D. Cooperative interaction of CTGF and TGF-beta in animal models of fibrotic disease. *Fibrogenesis Tissue Repair* 2011;4:4.
278. Abreu JG, Ketpura NI, Reversade B, De Robertis EM. Connective-tissue growth factor (CTGF) modulates cell signalling by BMP and TGF-beta. *Nat Cell Biol* 2002;4:599-604.
279. Yun SH, Shin JO, Lim BK, Kim KL, Gil CO, Kim DK, Jeon ES. Change in the cells that express connective tissue growth factor in acute Cocksackievirus-induced myocardial fibrosis in mouse. *Virus Res* 2007;126:62-8.
280. Matsumoto Y, Niimi N, Kohyama K. Characterization of fibrosis-promoting factors and siRNA-mediated therapies in C-protein-induced experimental autoimmune myocarditis. *Cell Immunol* 2012;279:70-7.
281. Hayata N, Fujio Y, Yamamoto Y, Iwakura T, Obana M, Takai M, Mohri T, Nonen S, Maeda M, Azuma J. Connective tissue growth factor induces cardiac hypertrophy through Akt signaling. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;370:274-8.
282. Turner NA, Porter KE. Regulation of myocardial matrix metalloproteinase expression and activity by cardiac fibroblasts. *IUBMB Life* 2012;64:143-50.
283. Papakrivopoulou J, Lindahl GE, Bishop JE, Laurent GJ. Differential roles of extracellular signal-regulated kinase 1/2 and p38MAPK in mechanical load-induced procollagen alpha1(I) gene expression in cardiac fibroblasts. *Cardiovasc Res* 2004;61:736-44.
284. Hu X, Wang H, Liu J, Fang X, Tao K, Wang Y, Li N, Shi J, Wang Y, Ji P, Cai W, Bai X, Zhu X, Han J, Hu D. The role of ERK and JNK signaling in connective tissue growth factor induced extracellular matrix protein production and scar formation. *Arch Dermatol Res* 2013;305:433-45.
285. Tan TW, Lai CH, Huang CY, Yang WH, Chen HT, Hsu HC, Fong YC, Tang CH. CTGF enhances migration and MMP-13 up-regulation via alphavbeta3 integrin, FAK, ERK, and NF-kappaB-dependent pathway in human chondrosarcoma cells. *J Cell Biochem* 2009;107:345-56.
286. Lavall D, Selzer C, Schuster P, Lenski M, Adam O, Schafers HJ, Bohm M, Laufs U. The mineralocorticoid receptor promotes fibrotic remodeling in atrial fibrillation. *J Biol Chem* 2014;289:6656-68.
287. Messaoudi S, Gravez B, Tarjus A, Pelloux V, Ouvrard-Pascaud A, Delcayre C, Samuel J, Launay JM, Sierra-Ramos C, Alvarez dIR, Clement K, Farman N, Jaisser F. Aldosterone-specific activation of cardiomyocyte mineralocorticoid receptor in vivo. *Hypertension* 2013;61:361-7.

288. Lyden D, Olszewski J, Huber S. Variation in susceptibility of Balb/c mice to coxsackievirus group B type 3-induced myocarditis with age. *Cell Immunol* 1987;105:332-9.
289. Huber SA, Pfaeffle B. Differential Th1 and Th2 cell responses in male and female BALB/c mice infected with coxsackievirus group B type 3. *J Virol* 1994;68:5126-32.
290. Li K, Xu W, Guo Q, Jiang Z, Wang P, Yue Y, Xiong S. Differential macrophage polarization in male and female BALB/c mice infected with coxsackievirus B3 defines susceptibility to viral myocarditis. *Circ Res* 2009;105:353-64.
291. Onyimba JA, Coronado MJ, Garton AE, Kim JB, Bucek A, Bedja D, Gabrielson KL, Guilarte TR, Fairweather D. The innate immune response to coxsackievirus B3 predicts progression to cardiovascular disease and heart failure in male mice. *Biol Sex Differ* 2011;2:2.
292. Keidar S, Hayek T, Kaplan M, Pavlotzky E, Hamoud S, Coleman R, Aviram M. Effect of eplerenone, a selective aldosterone blocker, on blood pressure, serum and macrophage oxidative stress, and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *J Cardiovasc Pharmacol* 2003;41:955-63.
293. Wang D, Liu YH, Yang XP, Rhaleb NE, Xu J, Peterson E, Rudolph AE, Carretero OA. Role of a selective aldosterone blocker in mice with chronic heart failure. *J Card Fail* 2004;10:67-73.
294. Keidar S, Kaplan M, Pavlotzky E, Coleman R, Hayek T, Hamoud S, Aviram M. Aldosterone administration to mice stimulates macrophage NADPH oxidase and increases atherosclerosis development: a possible role for angiotensin-converting enzyme and the receptors for angiotensin II and aldosterone. *Circulation* 2004;109:2213-20.
295. Keidar S, Gamliel-Lazarovich A, Kaplan M, Pavlotzky E, Hamoud S, Hayek T, Karry R, Abassi Z. Mineralocorticoid receptor blocker increases angiotensin-converting enzyme 2 activity in congestive heart failure patients. *Circ Res* 2005;97:946-53.
296. Suzuki J, Iwai M, Mogi M, Oshita A, Yoshii T, Higaki J, Horiuchi M. Eplerenone with valsartan effectively reduces atherosclerotic lesion by attenuation of oxidative stress and inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:917-21.
297. Franco V, Chen YF, Feng JA, Li P, Wang D, Hasan E, Oparil S, Perry GJ. Eplerenone prevents adverse cardiac remodeling induced by pressure overload in atrial natriuretic peptide-null mice. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2006;33:773-9.
298. Boehm M, Arnold N, Braithwaite A, Pickworth J, Lu C, Novoyatleva T, Kiely DG, Grimminger F, Ghofrani HA, Weissmann N, Seeger W, Lawrie A, Schermuly RT, Kojonazarov B. Eplerenone attenuates pathological pulmonary vascular rather than right ventricular remodeling in pulmonary arterial hypertension. *BMC Pulm Med* 2018;18:41.
299. Du L, Qin M, Yi Y, Chen X, Jiang W, Zhou L, Zhang D, Xu K, Yang Y, Li C, Liu Y, Liu X, Duan SZ. Eplerenone Prevents Atrial Fibrosis via the TGF-beta Signaling Pathway. *Cardiology* 2017;138:55-62.

300. Chen X, Zhang W, Wang Q, Du L, Yi Y, Liu Y, Liu X, Duan S. Eplerenone inhibits atrial fibrosis in mutant TGF-beta1 transgenic mice. *Sci China Life Sci* 2016;59:1042-7.
301. Pacher P, Nagayama T, Mukhopadhyay P, Batkai S, Kass DA. Measurement of cardiac function using pressure-volume conductance catheter technique in mice and rats. *Nat Protoc* 2008;3:1422-34.
302. Joho S, Ishizaka S, Sievers R, Foster E, Simpson PC, Grossman W. Left ventricular pressure-volume relationship in conscious mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007;292:H369-H77.
303. Watanabe M, Hitomi M, van der Wee K, Rothenberg F, Fisher SA, Zucker R, Svoboda KK, Goldsmith EC, Heiskanen KM, Nieminen AL. The pros and cons of apoptosis assays for use in the study of cells, tissues, and organs. *Microsc Microanal* 2002;8:375-91.
304. Chan AK, Sanderson JE, Wang T, Lam W, Yip G, Wang M, Lam YY, Zhang Y, Yeung L, Wu EB, Chan WW, Wong JT, So N, Yu CM. Aldosterone receptor antagonism induces reverse remodeling when added to angiotensin receptor blockade in chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2007;50:591-6.
305. Weir RA, Mark PB, Petrie CJ, Clements S, Steedman T, Ford I, Ng LL, Squire IB, Wagner GS, McMurray JJ, Dargie HJ. Left ventricular remodeling after acute myocardial infarction: does eplerenone have an effect? *Am Heart J* 2009;157:1088-96.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 - Zeitlicher Verlauf der murinen Virusmyokarditis..... 10

Abbildung 2 - Ablauf einer PCR. 30

Abbildung 3 - Schema der einfachen indirekten (A), (Strept-)Avidin-Biotin-Komplex (ABC)- (B) und Polymer-Methode (C). 37

Abbildung 4 - Mortalität. 48

Abbildung 5 - mRNA-Expression von ANP..... 52

Abbildung 6 - mRNA-Expression kardialer Zytokine. 54

Abbildung 7 - Proteinexpression von ICAM-1 und VCAM-1 (immunhistochemische Färbung)..... 55

Abbildung 8 - Färbung ICAM-1..... 56

Abbildung 9 - Infiltration von CD3- und CD11b-positiven Zellen (immunhistochemische Färbung)..... 57

Abbildung 10 - Färbung CD11b-positiver Zellen. 58

Abbildung 11 - Färbung Nitrotyrosin..... 59

Abbildung 12 - Proteinexpression von Nitrotyrosin und CVB3-Viruslast. 60

Abbildung 13 - Myokardiale Apoptoserate (TUNEL-Färbung)..... 61

Abbildung 14 - mRNA-Expression von MMPs..... 63

Abbildung 15 - mRNA-Expression von TIMPs..... 64

Abbildung 16 - Proteinexpression von MMP-9 (immunhistochemische Färbung). 65

Abbildung 17 - Enzymaktivität von MMP-2 und MMP-9. 66

Abbildung 18 - mRNA-Expression von Kollagen I und Kollagen III. 67

Abbildung 19 - Proteinexpression von Kollagen I und Kollagen III..... 67

Abbildung 20 - Gesamtkollagengehalt. 68

Abbildung 21 - Färbung Kollagen I.....	69
Abbildung 22 - Sirius Red-Färbung.....	70
Abbildung 23 - mRNA-Expression von CCN 2/CTGF.	71

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 – Mögliche Auslöser einer Myokarditis.	6
Tabelle 2 - Klinisch-pathologische Einteilung der Myokarditiden.....	8
Tabelle 3 - Einteilung und Abkürzung der Gruppen.	23
Tabelle 4 - Hämodynamisch bestimmte Parameter.	26
Tabelle 5 - Verwendete TaqMan® Gene Expression Assays.....	31
Tabelle 6 - Verwendete Primer und Sonde zur Bestimmung der Viruslast.....	32
Tabelle 7 - Verwendete Primär- und Sekundärantikörper für die Immunhistochemie. ..	40
Tabelle 8 - Verwendete Geräte.	43
Tabelle 9 - Verwendete Verbrauchsmaterialien.	44
Tabelle 10 - Verwendete Reagenzien.	45
Tabelle 11 - Tiercharakteristika.	47
Tabelle 12 - Hämodynamische Parameter.	51

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Robert Arndt, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: *„Einfluss der selektiven Mineralokortikoid-Rezeptor-Blockade (Eplerenon) in einem murinen Virusmyokarditismodell“* selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Lebenslauf

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

Publikationen

Jaeger S, Riad A, Arndt R, Rutschow S, Puhl K, Schultheiss HP, Tschoepe C, Pauschinger M

48 Eplerenone treatment in a CVB-3 induced myocarditis model reduces cardiac fibrosis resulting in an improved left ventricular function.

European Journal of Heart Failure Supplements, 2007

Arndt R, Schmidt S, Loddenkemper C, Grünbaum M, Zidek W, van der Giet M, Westhoff TH.

Noninvasive evaluation of renal allograft fibrosis by transient elastography - a pilot study.

Transpl Int. 2010 Sep;23(9):871-7.

Dimeo F, Pagonas N, Seibert F, Arndt R, Zidek W, Westhoff TH.

Aerobic exercise reduces blood pressure in resistant hypertension.

Hypertension. 2012 Sep;60(3):653-8.

Tepel M, Borst C, Bstrup C, Marcussen N, Pagonas N, Seibert FS, Arndt R, Zidek W, Westhoff TH.

Urinary calprotectin and posttransplant renal allograft injury.

PLoS One. 2014 Nov 17;9(11):e113006.

Seibert FS, Rosenberger C, Mathia S, Arndt R, Arns W, Andrea H, Pagonas N, Bauer F, Zidek W, Westhoff TH.

Urinary Calprotectin Differentiates Between Prerenal and Intrinsic Acute Renal Allograft Failure.

Transplantation. 2017 Feb;101(2):387-394.

Kongressbeiträge:

Sebastian Jäger, Alexander Riad, Robert Arndt, Susanne Rutschow, Kerstin Puhl, Heinz-Peter Schultheiss, Carsten Tschöpe und Matthias Pauschinger
Therapie mit Eplerenone verringert die kardiale Fibrose und verbessert die linksventrikuläre Dysfunktion im murinen CVB-3 Myokarditis Modell.
Clin Res Cardiol 2007 V1429

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. M. Pauschinger für die freundliche Überlassung des Themas. Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. C. Tschöpe für die Übernahme der Betreuung meiner Promotion nach dem Prof. Dr. med. M. Pauschinger die Charité verließ. Im Besonderen danke Herrn Prof. Dr. med. C. Tschöpe für die konstruktive Unterstützung bei der Planung der Experimente und der Niederschrift dieser Dissertation. Für die Möglichkeit, an seinem Institut meine für diese Promotion notwendigen experimentellen Untersuchungen durchzuführen, möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. H.-P. Schultheiss bedanken.

Mein ausdrücklicher Dank gebührt Herrn Dr. med. S. Jäger für seine Unterstützung und Hilfestellung bei der Einarbeitung, sowie Planung und Durchführung der experimentellen Arbeit. Die wissenschaftlichen Diskussionen mit ihm bildeten ein wichtiges Fundament für diese Promotion.

Bei Herrn Prof. Dr. med. D. Westermann und Herrn PD Dr. med. A. Riad bedanke ich mich für die Durchführung der hämodynamischen Messungen dieser Arbeit. Frau K. Puhl, Frau F. Bleis und Herrn G. Zingler gebührt mein Dank für die Einarbeitung und Hilfsbereitschaft während der Arbeiten im Labor.

Einen besonderen Dank möchte ich Herrn Dr. med. M. Koch für seine konstruktive Korrektur meines Manuskriptes aussprechen. Sein Engagement trug maßgeblich zur Vollendung dieser Dissertation bei. Auch Herrn Prof. Dr. med. R. Somasundaram möchte ich mit einem herzlichen Dank bedenken. Er ermöglichte mir den beruflichen Freiraum zur Vollendung meiner Promotion und unterstützte mich auch sonst während der finalen Phase der Anfertigung dieser Dissertation.

Außerordentlich möchte ich mich bei meiner Familie bedanken. Ohne die Unterstützung meiner Eltern, die mich immer wieder motivierten, wären das Studium der Humanmedizin und die Anfertigung dieser Dissertation nicht möglich gewesen. Der größte Dank gebührt jedoch meiner Ehefrau Marie-Jo. Sie ging mit mir durch die Hochs und Tiefs dieser Promotion. Ohne ihre fachlichen Ratschläge, ihre emotionale Unterstützung, ihr Verständnis, ihren Rückhalt und ihren Verzicht während der Entstehung dieser Dissertation wäre eine Fertigstellung nicht möglich gewesen.

Robert Arndt, Berlin im September 2019