

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

DISSERTATION

Der Einfluss der Inhibition von Faktor Xa auf die myokardiale
Inflammation und die linksventrikuläre Pumpfunktion im Rahmen
einer Cocksackievirus B3-induzierten Kardiomyopathie

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum medicinalium (Dr. rer. medic.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité–Universitätsmedizin Berlin

von

Ronny Malz

aus Luckenwalde

Datum der Promotion: 11. Dezember 2015

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|-----------|---|-------------|
| 1 | Zusammenfassung | 4 |
| 1.1 | Zusammenfassung | 4 |
| 1.2 | Abstract | 5 |
| 2 | Einleitung und Zielsetzung | 6 |
| 3 | Methodik | 7 |
| 4 | Ergebnisse und Diskussion | 10 |
| 4.1 | Einfluss der FXa-Hemmung auf die CVB3-induzierte Myokarditis | 10 |
| 4.2 | Rolle von PAR1 im Rahmen der CVB3-induzierten Myokarditis..... | 15 |
| 4.3 | Überexpression von alternativ-gespletem Tissue Factor ruft pro-angiogenes | |
| | und pro-migratorisches Verhalten in murinen kardiomyozytären HL-1 | |
| | Zellen hervor | 16 |
| 5 | Literatur | 18 |
| 6 | Eidesstattliche Versicherung | 20 |
| 7 | Lebenslauf | 22 |
| 8 | Publikationsliste | 25 |
| 9 | Danksagung | 28 |
| 10 | Ausdruck ausgewählte Publikation 1 | 113 |
| 11 | Ausdruck ausgewählte Publikation 2 | 1310 |
| 12 | Ausdruck ausgewählte Publikation 3 | 1235 |

1 Zusammenfassung

1.1 Zusammenfassung

Im Rahmen der ersten Studie wurde am Modell der Coxsackie Virus B3 (CVB3)-induzierten Myokarditis der Einfluss der Faktor Xa (FXa)-Hemmung auf die myokardiale Inflammation und die linksventrikuläre Pumpfunktion untersucht. Sowohl infizierte als auch nicht infizierte Mäuse wurden mit dem spezifischen FXa-Hemmer Fondaparinux behandelt und entsprechenden Vergleichsgruppen gegenüber gestellt. 8 Tage *p.i.* wurde die linksventrikuläre Pumpfunktion mittels Konduktanz-Katheter bestimmt. Das Myokardgewebe wurde immunhistologischen, molekularbiologischen und gelatinolytischen Kriterien unterzogen. Die Herzfunktion war infolge der Behandlung mit Fondaparinux in den infizierten Mäusen durch eine signifikante Verbesserung der globalen und der systolischen Parameter gekennzeichnet. In den Herzen dieser Tiere wurde darüber hinaus eine vermehrte Infiltration von CD68-positiven Makrophagen und insbesondere von CD206-positiven, anti-inflammatorischen M2-Typ Makrophagen gegenüber den unbehandelten CVB3-Tieren beobachtet. Die Anzahl der Viruskopien sowie die Expression der Zytokine IL-1 β , IFN- β und IFN- γ waren hingegen in beiden CVB3-Gruppen vergleichbar. Die MMP-2-Aktivität war nach der Applikation des FXa-Hemmers in den CVB3-infizierten Mäusen relevant reduziert. Die Quantifizierung der mRNA-Expression von TIMP-1 sowie der Kollagen I/III-Ratio und der Gesamtkollagen-Gehalt im Herzgewebe wiesen diesbezüglich keine signifikanten Unterschiede auf. Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass die Hemmung von FXa mit einer verminderten MMP-2-Aktivität im Herzen assoziiert ist. Trotz gesteigerter Immunzellinfiltration resultierte diese nicht in einem vermehrten kardialen Remodeling und führte sogar zu einer signifikanten Verbesserung der linksventrikulären Pumpfunktion. Dies ist möglicherweise mit einem verstärkten Auftreten anti-inflammatorischer M2-Typ-Makrophagen infolge der Behandlung zu erklären.

In der zweiten Studie wurde die Rolle des Protease-aktivierten Rezeptors (PAR)-1 im Rahmen der viralen Myokarditis untersucht. Entsprechende Studien an PAR1^{-/-}-Mäusen zeigten u. a. eine ausgeprägtere Inflammation und eine Verschlechterung der kardialen Funktion. Dies legt den protektiven Einfluss von PAR1 im Verlauf der Erkrankung dar.

Im Rahmen der dritten Studie wurden die Auswirkungen der Überexpression von alternativgespletem Tissue Factor (asTF) in murinen kardiomyozytäre HL-1 Zellen analysiert. Dies ging mit einer erhöhten mRNA-Expression u. a. von FGF2 und Cyr61 sowie mit einer Steigerung der Chemotaxis monozytärer THP-1 Zellen einher. Die Überexpression von asTF steht somit in Verbindung mit pro-angiogenen als auch mit pro-migratorischen Eigenschaften.

1.2 Abstract

In this study we investigated the effects of the inhibition of factor Xa (FXa) on myocardial inflammation and left ventricular function within the murine coxsackievirus B3 (CVB3)-induced myocarditis model. Infected and non-infected mice were treated with the specific FXa inhibitor fondaparinux or with saline respectively. 8 days *p.i.* left ventricular function was measured using a microconductance pressure catheter. The heart tissue was analyzed for immune histological, biomolecular and gelatinolytic criteria. Due to the treatment with fondaparinux the myocardial function, distinguished by global and systolic heart parameters, was significantly improved in the infected animals. More CD68-positive macrophages and, especially more CD208-positive anti-inflammatory M2-type macrophages were found in the infected mice treated with fondaparinux compared to those treated with saline. The viral load and the expression levels of IL-1 β , IFN- β and IFN- γ cytokine were equal in both infection groups. The gelatinolytic MMP-2 activity was reduced in infected mice after treatment with the FXa inhibitor. The expression level of TIMP-1, the collagen I/III-ratio and the total collagen content in the myocardial tissue were not altered. Despite an increased immune cell infiltration as a result of fondaparinux treatment, the inhibition of FXa was not associated with more cardiac remodeling and even led to an improvement of left ventricular heart function. Therefore, we assume that both, the reduction of myocardial MMP-2 activity and the increase of anti-inflammatory M2-type macrophages infiltration contribute to the resolution of myocardial inflammation and myocardial remodeling resulting in a better cardiac outcome.

In the second study, we investigated the role of protease-activated receptor (PAR)-1 in the context of CVB3-induced myocarditis. The studies were performed on PAR1^{-/-} mice and revealed massive cardiac inflammation resulting in the deterioration of cardiac function. This demonstrated the protective role of receptor PAR1 within the disease pattern of viral-induced myocarditis.

The third study illustrates the impact of alternative spliced tissue factor (asTF) overexpression on murine cardiomyocytic HL-1 cells. This was associated with an upregulated expression of the factors FGF2 and Cyr61 as well as with an increased chemotaxis of monocytic THP-1 cells. These findings point to both, pro-angiogenic and pro-migratory potential of asTF-overexpression in HL-1 cells.

2 Einleitung und Zielsetzung

Die Myokarditis ist eine potentiell lebensbedrohliche Entzündung des Herzmuskels, welche durch kardiotope Viren wie das Coxsackievirus B3 (CVB3) hervorgerufen wird. Eine virale Infektion des Herzens kann eine myokardiale Dysfunktion verursachen und somit zu ventrikulärer Dilatation führen. Die virus-induzierte myokardiale Inflammation ist eng mit der Aktivierung der Koagulationskaskade verbunden, mit einer erhöhten Blutgerinnung und mit einem vermehrten Auftreten thrombotischer Ereignisse assoziiert. Darüber hinaus wurde unter inflammatorischen Bedingungen eine Verstärkung rezeptorvermittelter, zellulärer Signaltransduktion beobachtet, welche mit dem Umbau der extrazellulären Gewebematrix in Verbindung steht. Der Gewebefaktor (Tissue factor, TF), der Initiator der Koagulationskaskade, wird u. a. im Herzen exprimiert und während der subakuten Phase der virus-induzierten Myokarditis stark hoch reguliert. TF im Komplex mit dem Koagulationsfaktor (F) VIIa aktiviert FX zu FXa. FXa aktiviert Prothrombin zu Thrombin, weshalb ihm eine zentrale Rolle innerhalb der Gerinnungskaskade zukommt. Die Spaltung von Prothrombin zu Thrombin resultiert ihrerseits in der Aktivierung von Proteinase-aktivierten Rezeptoren (PAR) und in der Generierung von Fibrin. FXa induziert somit die zelluläre Signaltransduktion und löst inflammatorische Reaktionen aus. Unsere Arbeitsgruppe konnte am murinen Myokarditismodell eindrucksvoll zeigen, dass die Aktivierung von PAR2 sich negativ auf die angeborene Immunantwort nach einer CVB3-Infektion auswirkt und somit zur myokardialen Dysfunktion beiträgt (1). Der PAR1-vermittelte Signalweg hingegen trägt positiv zur Immunreaktion nach einer Infektion mit einzelsträngigen RNA-Viren bei (2). FXa, die aktivierende Protease von PAR1 und PAR2 (3), wird u. a. in Immunzellen wie Makrophagen synthetisiert und infolge der Immunabwehr verstärkt lokal in das entzündete Gewebe sezerniert. Des Weiteren aktiviert FXa die Matrixmetalloproteinasen (MMP)-2 und -9. Sowohl MMP-2 als auch MMP-9 spielen eine wichtige Rolle bei der kardialen Entzündung und beim Abbau der extrazellulären Matrix. Dieser resultiert im myokardialen Gewebeumbau und in linksventrikulärer Dysfunktion. FXa stellt somit einen potentiellen Therapieansatz für die Behandlung der viralen Myokarditis dar.

Ziel dieser Promotion war es, 1. die Bedeutung der Hemmung von FXa mittels des spezifischen FXa-Inhibitors Fondaparinux für die myokardiale Inflammation zu untersuchen, und 2. den Einfluss der myokardialen Expression und der Aktivierung von FX auf das kardiale „Matrix-Remodelling“ und damit auf die linksventrikuläre Herzfunktion im Verlauf einer viral-induzierten Myokarditis zu erfassen. Hierfür wurden *in vivo*-Experimente an CVB3-infizierten Mäusen durchgeführt, welchen für den Zeitraum der subakuten Phase der Myokarditis 8 Tage nach der Infektion (*post infectionem, p.i.*) der spezifische FXa-Inhibitor Fondaparinux verabreicht wurde.

Koagulationsproteasen sind über ihre Rolle innerhalb der Gerinnungskaskade hinaus in der Lage PARs zu aktivieren. Virale Infektionen induzieren die TF-Expression u. a. in Monozyten und Endothelzellen. Weiterhin ist die Expression von PAR1 in Endothelzellen nach einer viralen Infektion erhöht. Studien mit kultivierten Endothelzellen brachten hervor, dass TF, Thrombin, PAR1 und PAR2

der Infektiösität des DNA-Virus Herpes Simplex Virus Typ 1 zuträglich sind. Thrombin ist der Hauptaktivator von PAR1 und aktiviert diverse intrazelluläre Signalwege wie den MAP-Kinase-Weg. Darüber hinaus trägt PAR1 zur Proliferation von kardialen Fibroblasten und der Hypertrophie von Kardiomyozyten bei. Zudem spielt PAR1 eine wichtige Rolle bei der kardialen Heilung und beim Gewebeumbau nach einer I/R-Schädigung.

Der myokardiale Infarkt ist eine häufig tödlich verlaufende Krankheit (4). Diese geht mit einer verminderten systolischen Herzfunktion und mit kardialen Arrhythmien einher. Aus diesem Grunde ist eine Verbesserung der Blutversorgung des infarzierten Herzmuskels durch die Bildung von Mikrogefäßen ein potentieller Behandlungsansatz (5). Die Angiogenese sowie die Zellproliferation sind entscheidend für die regenerative Ausbildung neuer Blutgefäße. Beide Prozesse werden verstärkt durch bioaktive Moleküle wie „Fibroblast growth factor-2“ (FGF2) und „Cysteine-rich 61“ (Cyr61, CCN1) (6, 7). TF, der Initiator der Blutgerinnungskaskade, wird infolge alternativen Splicens in zwei Isoformen, der „full length“ (flTF) und der „alternatively spliced“ (asTF) in verschiedenen Zellen des Herzens exprimiert (8). Unsere Arbeitsgruppe hat kürzlich veröffentlicht, dass beide Isoformen im Herzgewebe von Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie herunter reguliert waren (9). Im Gegensatz zu flTF ist über die biologische Funktion von asTF bislang nur wenig bekannt. Es wird vermutet, dass die Expression von humanem asTF neben seiner geringen pro-koagulativen Aktivität, vor allem mit einer erhöhten Zellproliferation und mit gesteigerter Angiogenese in Verbindung steht (10). Diese Beobachtungen legen nahe, dass asTF möglicherweise eine wichtige Rolle bei regenerativen Prozessen wie der Angiogenese und der Zellproliferation spielt.

3 Methodik

Die pharmakologischen Experimente hinsichtlich der FXa-Hemmung wurden an 6 bis 8 Wochen alten, männlichen C57Bl/6J Wildtyp (WT)-Mäusen durchgeführt, welche zu 7 bis 10 Tieren pro Gruppe aufgeteilt wurden. Die Hemmung von FXa erfolgte durch die intraperitoneale (i.p.) Gabe des spezifischen FXa-Inhibitor Fondaparinux Arixtra (GlaxoSmithKline, München, Deutschland; 20 mg/kg, zweimal täglich). Die Infektion der Mäuse wurde durch die Injektion von 1×10^5 plaque forming units (PFU) i.p. des kardiotropen CVB3 „Nancy Stain“ (ATCC VR-30) induziert. Die Mäuse wurden 1 h vor der Infektion mit einem Bolus von 20 mg/kg Fondaparinux vorbehandelt. Anschließend wurden die Tiere zweimal täglich bis zur Tötung 8 Tage *p.i.* behandelt. Dieser Zeitpunkt wurde gewählt, um die inflammatorischen Prozesse während der subakuten Phase der Myokarditis zu untersuchen. Die Züchtung und die Experimente wurden entsprechend der Richtlinien des National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Pub. No. 85-23, Revised 1996) durchgeführt und vom Landesamt für Gesundheit und Soziales (Berlin, Deutschland; No. G0048/09) genehmigt. Die Messung der Hämodynamik zur Charakterisierung der linksventrikulären Pumpfunktion wurde 8 Tage *p.i.* mittels eines 1.2-F Mikrokonduktanzkatheters (SciSense, Ontario, Kanada) wie zuvor be-

schrieben durchgeführt. Die Tiere erhielten zu diesem Zwecke eine Betäubung mit 1,5 g/kg Urethane (Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland). Die systolische Herzfunktion wurde durch den linksventrikulären endsystolischen Druck (LVESP) [mmHg], den maximalen linksventrikulären Druck (LVP_{max}) [mmHg] und die maximale linksventrikuläre Druckerhöhungsgeschwindigkeit (dP/dt_{max}) [mmHg/s] beschrieben. Die diastolische Funktion wurde anhand der maximalen linksventrikulären Druckabfallgeschwindigkeit (dP/dt_{min}) [mmHg/s] bestimmt. Die globale Herzfunktion wurde charakterisiert durch das Schlagvolumen (SV) [μ l] und das Herzzeitvolumen (HZV) [μ l/min]. Die Anti-FXa-Aktivität im Blutplasma der Mäuse wurde mittels des chromogenen Biophen Heparin (AT+) Assay (CoaChrom Diagnostica; Wien, Österreich) gemessen. Die Bestimmung der kardialen Expression von Interleukin (IL)-1 β , Interferon (IFN)- β , IFN- γ und des Gewebehemmers der MMP's (TIMP)-1 erfolgte via Real-Time PCR (Applied Biosystems, Branchburg, NJ, USA). Dabei wurde für jedes Tier eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Als Referenz wurde die Expression der s18 rRNA herangezogen. Die Gesamt-RNA aus dem Herzgewebe der Mäuse wurde mit peqGold TriFast (Peqlab; Erlangen, Deutschland) aufgereinigt und mittels des High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Branchburg, NJ, USA) in cDNA umgeschrieben. Immunhistochemische Färbungen wurden für CD68 (Abcam; Cambridge, UK), CD80 (BD Bioscience; Heidelberg, Deutschland), CD206 (Abcam; Cambridge, UK), Kollagen Typ I (Chemicon; Temecula, CA, USA) und Typ III (Calbiochem - Merck KGaA; Darmstadt, Deutschland) durchgeführt. Die morphometrische Quantifizierung erfolgte mit Hilfe des Programms Lucia G Version 3.52ab (Nikon GmbH; Düsseldorf, Deutschland) und wurde in [Zellen/ mm^2] bzw. in [mm^2/mm^2] angegeben. Das Gesamtkollagen im Herzen der Tiere wurde mittels Sirius-Red gefärbt und dessen Gehalt am Polarisationsmikroskop Nikon Eclipse E600 POL mit der dazugehörigen Software Lucia-G-Version (Nikon GmbH; Düsseldorf, Deutschland) ausgewertet. Die gelatinolytische Aktivität von MMP-2 wurde unter Zuhilfenahme der Zymographie mit anschließender Coomassie-Färbung (BioRad; München, Deutschland) visualisiert und unter Verwendung der Software Image J Version 1.43u (National Institutes of Health; Bethesda, MD, USA) quantifiziert. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm Prism Version 4.0 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA). Alle Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler (Standard Error of the Mean, SEM) dargestellt und stammten aus mindestens sechs unabhängigen Experimenten. Die Normalverteilung wurde nach der Kolmogorov-Smirnov-Methode bestimmt. Die Signifikanz zweier Gruppen wurde mittels Mann-Whitney U-Test geprüft und alle Werte $p < 0,05$ als statistisch signifikant definiert.

In der zweiten Studie wurde die Rolle von PAR1 in Rahmen der CVB3-induzierten Myokarditis untersucht. Zu diesem Zwecke wurden WT-Mäuse und PAR1^{-/-}-Mäuse auf genetischer Grundlage von C57Bl/6J WT-Mäusen 11 Generationen zurückgekreuzt. Die WT- und PAR1^{-/-}-Tiere wurden in Inzuchtlinien gezüchtet. Um eine kardiomyozytäre Überexpression von PAR1 in C57Bl/6J WT-Mäusen zu erzeugen wurde der MHC-Promotor verwendet. Die Bestimmung der Herzfunktion erfolgte echokardiographisch unter Verwendung des Vevo 660 Ultrasound Systems (VisualSonics; Toronto, Kana-

da). Dabei wurden die Dimensionen des linken Ventrikels am Ende der systolischen sowie der diastolischen Phase gemessen und aus jeweils vier Herzzyklen gemittelt. Der Fraction shortening (FS)-Wert wurde auf Grundlage der erhobenen Ventrikeldaten errechnet. Die Bestimmung des CVB3-Virustiters [PFU/g] wurde an HeLa-Zellen mittels Plaque-Assays durchgeführt. Alle Daten sind dargestellt als Mittelwert \pm SEM aus mindestens 4-10 unabhängigen Experimenten. Die statistische Auswertung erfolgte mittels *zweiseitigem Student t-Test*. Dabei wurde alle Werte $p < 0,05$ als statistisch signifikant definiert.

In der dritten Studie wurden die Auswirkungen einer Überexpression von asTF in murinen kardiomyozyten-ähnlichen HL-1 Zellen hinsichtlich ihres pro-angiogenen Potentials, insbesondere der Expression der pro-angiogenen Faktoren FGF2 und Cyr61, sowie hinsichtlich der Chemotaxis von Monozyten untersucht. Die HL-1 Zellen sowie die humanen, monozytären THP-1 Zellen wurden in Claycomb-Medium bzw. in RPMI-Medium mit jeweils 10% fötales Kälberserum (PAA Laboratories, Pasching Austria) bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luft kultiviert. Für Transfektionsexperimente wurde das Plasmid pEGFP-N1 (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) verwendet. Ein cDNA-Konstrukt des murinen asTF wurde in die multiple cloning site des Plasmid geklont. Qualität, Orientierung und Identität des asTF-überexprimierenden Vektors (pEGFP-N1_asTF) wurden durch automatisierte Sequenzierung bestätigt. Für Kontroll-Transfektionen wurde der Leervektor (pEGFP-N1_LV) verwendet. Um eine stabile Transfektion von HL-1 Zellen zu erreichen, wurden 5×10^6 HL-1 Zellen pro Well einer 6-Well-Platte ausgesät. Die Transfektion mit pEGFP-N1_asTF bzw. pEGFP-N1_LV wurde unter Zuhilfenahme des LipofectaminTM 2000-Kits (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Um eine Selektion der stabilen Transfektanten zu erreichen, wurden die transfizierten Zellen anschließend mit 800 µg/ml Gentamycin (PAA Laboratories) inkubiert. Die stabile Überexpression wurde fortwährend mittels Real-Time PCR geprüft. Die dabei benutzten spezifischen Genexpressionssonden für FGF2 und Cyr61 (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) wurden nach Herstellerangaben verwendet. Der Nachweis der Zellmigration *in vitro* erfolgte anhand von Transwell-Einsätzen (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland) mit einer Porengröße von 8 µm passend für 24-Well-Platten. Es wurden 1×10^6 THP-1 Zellen in 100 µl frischem, serumfreiem RPMI resuspendiert und in die obere Kammer gesetzt. 800 µl des Zellkulturüberstandes von asTF-überexprimierenden HL-1 Zellen bzw. von mit Leervektor-transfizierten HL-1 Kontrollzellen wurde in die untere Kammer gegeben. Als negative Kontrolle wurde serumfreies RPMI-Medium benutzt. Die Zellen wurden für 48 h bei 37°C inkubiert. Anschließend konnten die Anzahl der in die untere Kammer migrierten Zellen mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer unter dem Lichtmikroskop Leica DMIL (*Leica*, Wetzlar, Deutschland) bestimmt werden. Alle Daten – dargestellt als Mittelwert \pm SEM aus mindestens drei unabhängigen Experimenten – wurden mittels *Student t-Test* statistisch analysiert. Dabei wurde alle Werte $p < 0,05$ und $p < 0,01$ als statistisch signifikant definiert. Als statistische Tendenz wurden alle Werte $p < 0,15$ angesehen.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Einfluss der FXa-Hemmung auf die CVB3-induzierte Myokarditis

In der ersten Studie der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss der FXa-Hemmung auf die linksventrikuläre Funktion und die Inflammation im Rahmen der CVB3-induzierten Myokarditis am Mausmodell untersucht. Hierzu wurden hämodynamische Messungen zum Zeitpunkt der subakuten Phase 8 Tage *p.i.* durchgeführt (**Tabelle 4-1**). Die systolischen Herzparameter LVESP [mmHg] und LVP_{max} [mmHg] in den infizierten Tieren waren signifikant reduziert verglichen mit den nicht infizierten, unbehandelten Tieren. dP/dt_{max} [mmHg/s] war in diesen Mäusen tendentiell verringert. Die Behandlung mit Fondaparinux nach der Infektion mit CVB3 zeigte eine signifikante Verbesserung der systolischen linksventrikulären Herzfunktion gegenüber den infizierten, mit Saline behandelten Tieren. Die diastolische Herzfunktion, dargestellt durch dP/dt_{min} [mmHg/s], war in den infizierten Tieren, im Vergleich zu den nicht infizierten unbehandelten Mäusen, ebenfalls signifikant verschlechtert. Infolge der Behandlung mit Fondaparinux blieb die diastolische Herzfunktion gegenüber den unbehandelten CVB3-Mäusen unverändert. Die HF [Schläge/min] und das HZV [μ l/min] waren in den infizierten, mit Saline behandelten Mäusen, gegenüber den nicht infizierten Kontrolltieren, signifikant reduziert. Diese Ergebnisse weisen auf eine Verschlechterung der globalen Herzfunktion hin. Nach der Behandlung mit Fondaparinux beobachteten wir in den infizierten Tieren eine signifikante Verbesserung der globalen Herzfunktion, dargestellt durch das SV [μ L] und das HZV [μ l/min].

Tabelle 4-1: Aufgeführt sind die hämodynamischen Parameter 8 Tage *p.i.*. K = nicht infiziert, Saline-behandelt; CVB3 = CVB3-infiziert, Saline behandelt; Fon K = nicht infiziert, Fondaparinux-behandelt; CVB3 Fon = CVB3-infiziert, Fondaparinux-behandelt; HF = Herzfrequenz, SV = Schlagvolumen, HZV = Herzzeitvolumen, LVP_{max} = maximaler linksventrikulärer Druck, LVESP = linksventrikulärer endsystolischer Druck, dP/dt_{max} = maximale linksventrikuläre Druckanstiegsgeschwindigkeit, dP/dt_{min} = maximale linksventrikuläre Druckabfallgeschwindigkeit). Die Daten wurden mittels Mann-Whitney U-Test statistisch analysiert (Mittelwert \pm SEM; § = $p < 0,05$ vs K; \$ = $p < 0,05$ vs Fon K; * = $p < 0,05$ vs CVB3, n = 7-10 Mäuse/Gruppe).

| Versuchsgruppe | K | Fon K | CVB3 | CVB3 Fon |
|----------------------------------|-------------------|-------------------|---------------------|----------------------|
| Globale Herzfunktion | | | | |
| HF [Schläge/min] | 519,7 \pm 10,51 | 541,2 \pm 13,52 | 414,7 \pm 17,49 § | 454,1 \pm 20,88 \$ |
| SV [μ l] | 26,42 \pm 3,127 | 23,03 \pm 3,660 | 19,32 \pm 2,236 | 33,19 \pm 4,893 * |
| HZV [μ l/min] | 13886 \pm 1868 | 12596 \pm 2057 | 8088 \pm 1035 § | 15124 \pm 2183 * |
| Systolische Herzfunktion | | | | |
| LVP_{max} [mmHg] | 55,83 \pm 3,642 | 56,62 \pm 4,257 | 42,01 \pm 2,787 § | 56,15 \pm 3,190 * |
| LVESP [mmHg] | 47,17 \pm 3,085 | 45,47 \pm 4,263 | 35,03 \pm 2,913 § | 50,44 \pm 2,911 * |
| dP/dt_{max} [mmHg/s] | 4499 \pm 489,6 | 4075 \pm 440,8 | 3131 \pm 374,0 | 4632 \pm 499,6 |
| Diastolische Herzfunktion | | | | |
| dP/dt_{min} [mmHg/s] | -2936 \pm 253,8 | -2864 \pm 251,1 | -1974 \pm 221,3 § | -2641 \pm 245,4 |

In beiden infizierten Gruppen wurde die CVB3-Viruslast [virale Genome/ μl cDNA] im Herzen untersucht und miteinander verglichen. Dabei wurde kein signifikanter Unterschied festgestellt (CVB3-Genome: Fondaparinux $3,163 \times 10^6 \pm 1,110 \times 10^6$ vs Saline $1,427 \times 10^6 \pm 0,649 \times 10^6$).

Die Herzen der Tiere aller vier Gruppen wurden hinsichtlich der Infiltration von Immunzellen und auf die Expression inflammatorischer Marker analysiert. Myokardiale Einblutungen infolge der Behandlung wurden in keiner der beiden Fondaparinux-Gruppen beobachtet (Daten nicht dargestellt). In den Herzen der Tiere beider CVB3-Gruppen zeigte sich 8 Tage *p.i.* im Vergleich zu den entsprechenden nicht infizierten Gruppen eine signifikante Erhöhung des allgemeinen Makrophagen-Markers CD68 [Zellen/ mm^2] (**Abbildung 1A**).

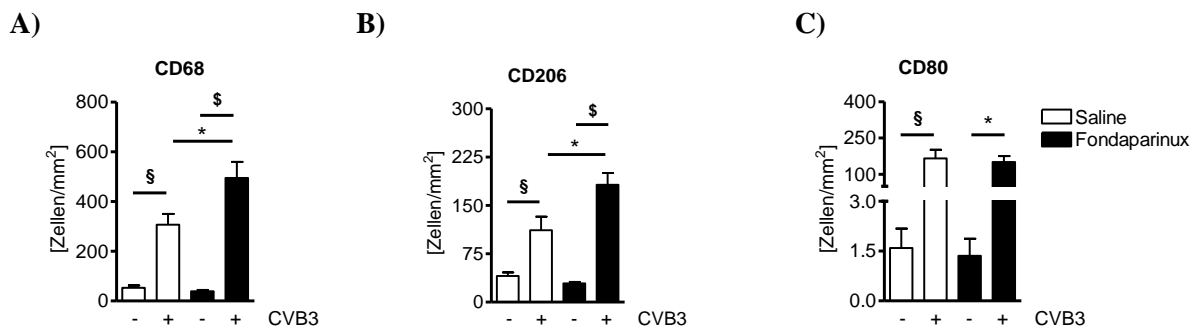


Abbildung 1: Die Abbildung stellt die quantitative Auswertung der immunhistologischen Färbung von **A)** CD68-positiven Zellen, **B)** CD206-positiven Zellen und **C)** CD80-positiven Zellen an Herzschnitten von nicht infizierten (-) und infizierten Mäusen (+) 8 Tage *p.i.* dar. Die Mäuse wurden mit Fondaparinux (in schwarz) bzw. mit Saline (in weiß) behandelt. Die Daten wurden mittels Mann-Whitney U-Test statistisch analysiert (Mittelwert \pm SEM; § = $p < 0,05$ vs K; § = $p < 0,05$ vs Fon K; * = $p < 0,05$ vs CVB3; n = 7-10 Mäuse/Gruppe).

Dabei fanden sich in den Herzen der infizierten Mäuse, welche mit Fondaparinux behandelt wurden, mehr Infiltrate von CD68-positiven Zellen als in den Saline-behandelten CVB3-Tiere. Anhand des Markers CD206 [Zellen/ mm^2] wurde in den Herzen der infizierten, mit Fondaparinux behandelten Tiere eine signifikant höhere Anzahl an M2-Typ-Makrophagen gegenüber der unbehandelten CVB3-Gruppe beobachtet (**Abbildung 1B**). Im Gegensatz dazu war die Anzahl an M1-Typ-Makrophagen, welche durch den Marker CD80 [Zellen/ mm^2] gekennzeichnet sind, in beiden infizierten Gruppen vergleichbar (**Abbildung 1C**). Die relativen mRNA-Expressionslevel von IL-1 β , IFN- β und IFN- γ (**Abbildung 2**) waren in beiden CVB3-Gruppen verglichen mit den entsprechenden nicht infizierten Gruppen signifikant erhöht. Infolge der Behandlung mit Fondaparinux waren diesbezüglich keine Unterschiede zwischen beiden infizierten Gruppen festzustellen.

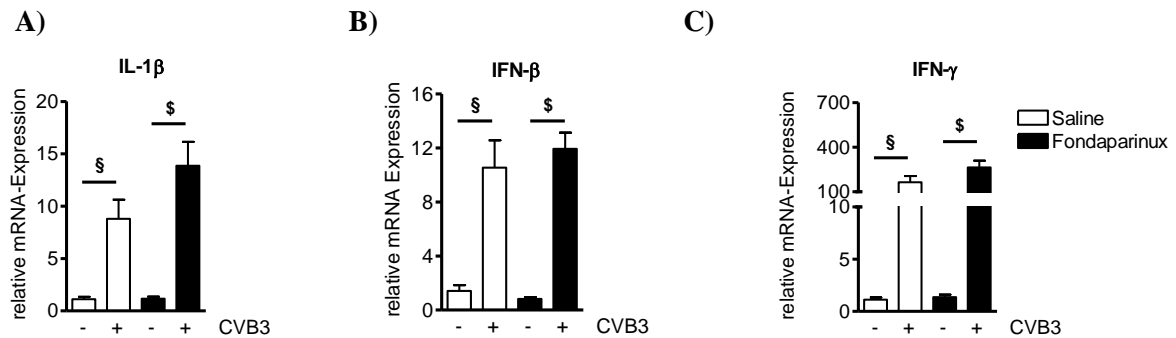


Abbildung 2: Die Abbildung stellt die relativen mRNA-Expressionen von **A)** IL-1 β , **B)** IFN- β und **C)** IFN- γ im Herzgewebe von nicht infizierten (-) und infizierten Mäusen (+) 8 Tage *p.i.* dar. Die Mäuse wurden mit Fondaparinux (in schwarz) bzw. mit Saline (in weiß) behandelt. Die mittels Real-Time PCR gemessenen Ct-Werte des Zielgens wurden gegen den Ct-Wert der 18s mRNA normalisiert und zur nicht infizierten mit Saline behandelten Kontrollgruppe relativiert. Die Daten wurden unter Verwendung des Mann-Whitney U-Test statistisch analysiert (Mittelwert \pm SEM; § = $p < 0,05$ vs K; § = $p < 0,05$ vs Fon K; n = 7-10 Mäuse/Gruppe).

In beiden CVB3-Gruppen wurde im Vergleich zu den nicht infizierten Tieren eine signifikante Steigerung der gelatinolytischen MMP-2-Aktivität beobachtet (**Abbildung 3A**). Die Gabe von Fondaparinux führte zu einer Reduktion der myokardialen MMP-2-Aktivität 8 Tage *p.i.*. Das relative mRNA-Expressionslevel von TIMP-1 war ebenfalls in den infizierten Tieren höher als in den nicht infizierten Tieren, jedoch infolge der FXa-Hemmung unverändert (**Abbildung 3B**). Der Kollagen I/III-Ratio [mm^2/mm^2] (**Abbildung 3C**) und der Gehalt an Gesamtkollagen [mm^2/mm^2] (**Abbildung 3D**) zeigten sich 8 Tage *p.i.* in beiden CVB3-Gruppen erhöht. Nach der Behandlung mit Fondaparinux waren mehr Makrophagen im infizierten Herzgewebe nachweisbar als in den Herzen der mit Saline behandelten Tiere. Dennoch waren sowohl der Kollagen I/III-Ratio (**Abbildung 3C**) als auch der Gehalt an Gesamtkollagen (**Abbildung 3D**) in beiden infizierten Gruppen vergleichbar hoch.

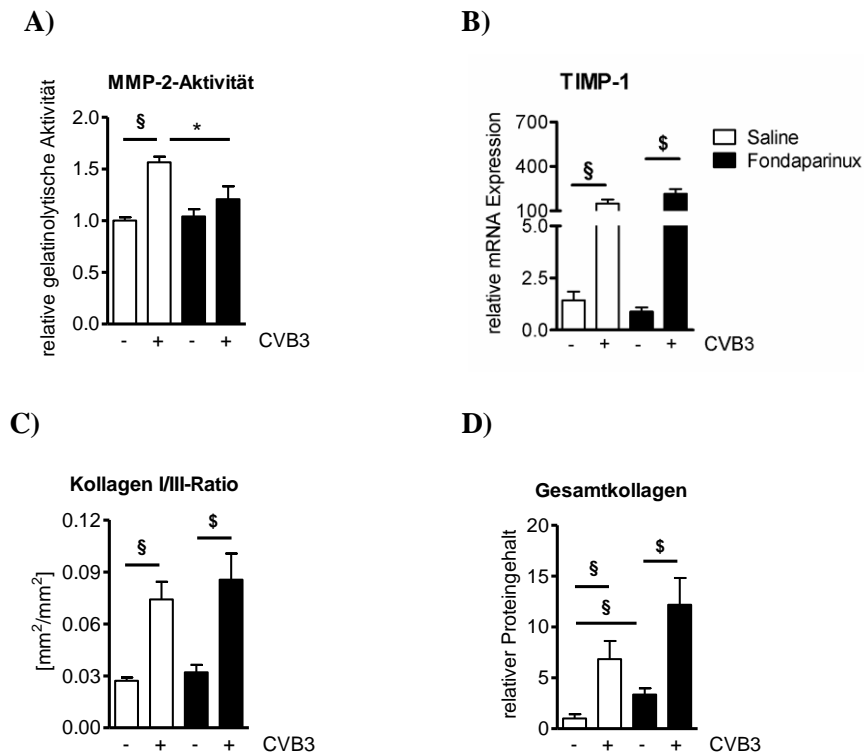


Abbildung 3: Dargestellt sind **A)** die relative MMP-2-Aktivität **B)** die relative mRNA-Expression von TIMP-1, **C)** der Kollagen I/III-Ratio und **D)** der Gesamtkollagengehalt im Herzgewebe von nicht infizierten (-) und infizierten Mäusen (+) 8 Tage *p.i.*. Die Mäuse wurden mit Fondaparinux (in schwarz) bzw. mit Saline (in weiß) behandelt. Die Daten wurden mittels Mann-Whitney U-Test statistisch analysiert (Mittelwert \pm SEM; § = $p < 0,05$ vs K; § = $p < 0,05$ vs Fon K; * = $p < 0,05$ vs CVB3; $n = 7-10$ Mäuse/Gruppe).

MMP-2 spielt eine wichtige Rolle beim Abbau der extrazellulären Matrix und beim kardialen Remodelling. Li *et al.* haben veröffentlicht, dass die Hemmung von MMPs zur Verbesserung der kardialen Funktion während der akuten Phase der CVB3-induzierten Myokarditis beiträgt (11). In der vorgelegten Arbeit ist die MMP-2-Aktivität in den CVB3-infizierten Tieren, welche mit Fondaparinux behandelt wurden, reduziert. Trotz der vermehrten Infiltration von Makrophagen in das Myokardgewebe infolge der FXa-Hemmung, waren sowohl der Kollagen I/III-Ratio als auch der Gesamtkollagengehalt in dieser Gruppe gegenüber den Saline-behandelten CVB3-Tieren nicht erhöht. Die Expression von TIMP-1 war nach der Behandlung mit Fondaparinux ebenfalls unverändert. Dies deutet auf ein verringertes Remodelling nach der inflammatorischen Verletzung des Herzgewebes hin. Ein verringertes myokardiales Remodelling wurde ebenfalls nach Gabe von niedermolekularem Heparin (LMWH), welches indirekt FXa und Thrombin inhibiert, 58 Tage *p.i.* beobachtet. Sowohl FXa als auch Thrombin aktivieren MMP-2 und beeinflussen somit den kardialen Umbau (17, 30). Kardiales Remodelling findet vorwiegend während der chronischen Phase der Myokarditis statt. Der Untersuchungszeitpunkt im Rahmen dieser Studie ist daher mit 8 Tagen *p.i.* möglicherweise zu früh gewählt, um signifikante Veränderungen der Kollagen I/III-Ratio sowie des Gesamtkollagengehalts zwischen beiden infizierten Gruppen festzustellen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen die Aktivität von MMP-2 in den Herzen der CVB3-infizierten Tiere im Vergleich zu den nicht infizierten Tieren erhöht. Dies stimmt mit den Arbeiten von Marchant *et al.* überein (12). Zudem haben kürzlich veröffentlichte Studien die Reduktion der Expression oder der Aktivität von MMP-2 mit einer vermehrten Infiltration von Immunzellen im Myokardgewebe im Zusammenhang gebracht. Westermann *et al.* publizierten eine massive Erhöhung der Infiltration von CD4-positiven Zellen in CVB3-infizierten MMP-2^{-/-}-Mäusen gegenüber infizierten WT-Mäusen (13). Matsusaka *et al.* wiesen mehr Makrophagen in den Herzen von MMP-2^{-/-}-Mäusen mit einer herzspezifischen TNF- α -Überexpression im Vergleich zu den entsprechenden WT-Kontrollen nach (14). Unter pro-inflammatorischen Bedingungen ist ein Mangel an MMP-2-Aktivität also mit einem erhöhten Vorkommen an Makrophagen im Gewebe verknüpft. In der vorliegenden Arbeit war die MMP-2-Aktivität infolge der FXa-Hemmung reduziert und mit einer gesteigerten Infiltration Makrophagen (CD68) assoziiert. Dabei traten vermehrt anti-inflammatorische CD206-positive M2-Typ-Makrophagen im Gewebe auf. Im Gegensatz dazu waren die Anzahl der pro-inflammatorischen CD80-positiven M1-Typ-Makrophagen und die Expression von IL-1 β , IFN- β und IFN- γ durch die Behandlung mit Fondaparinux unverändert. Studien haben gezeigt, dass Makrophagen vom pro-inflammatorischen M1-Phenotyp in den anti-inflammatorischen M2-Phenotyp umprogrammiert werden können, was in der Auflösung des Inflammationsherdes und in der Beseitigung apoptotischer Zellen resultiert. Des Weiteren beeinflusst dieser Umprogrammierungsprozess die Reparatur des Gewebes während der Regenerierungsphase der erfolgten Herzschädigung. Die Hemmung von FXa steht in Verbindung mit einer Verbesserung der linksventrikulären Pumpfunktion nach der Infektion mit CVB3. Dies stimmt mit den Befunden von Matsusaka *et al.* überein (14). Diese Autoren beschrieben eine bessere kardiale Funktion in MMP-2^{-/-}-Mäusen nach dem Setzen eines Aortenbandes, wodurch eine Hypertrophie des Herzmuskels induziert wird. FXa ist ein wichtiger Aktivator von PAR2. Antoniak *et al.* haben am murinen Ischämie/Reperfusion-Modell veranschaulicht, dass ein PAR2^{-/-} mit weniger myokardialen Remodelling und geringerer Beeinträchtigung der kardialen Funktion nach einem Infarkt einhergeht als bei entsprechenden WT-Kontrollen (15). Darüber hinaus hat unsere Gruppe kürzlich an CVB3-infizierten PAR2^{-/-}-Mäusen ein vermindertes, myokardiales Remodelling und eine verbesserte Herzfunktion nachgewiesen.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die Hemmung von FXa im Rahmen einer CVB3-induzierten Myokarditis zur signifikanten Verbesserung der linksventrikulären Herzfunktion in Mäusen 8 Tage *p.i.* beiträgt. Die Hemmung von FXa verringerte die MMP-2-Aktivität im Herzgewebe. Der myokardiale Kollagengehalt sowie die Expression von TIMP-1 waren vergleichbar in beiden infizierten Gruppen. Hingegen waren die Herzen der infizierten mit Fondaparinux behandelten Tiere von mehr Makrophagen infiltriert. Zudem fanden wir mehr anti-inflammatorische M2-Typ-Makrophagen in den mit Fondaparinux behandelten CVB3-Tieren als in den infizierten Kontrolltieren. Zusammenfassend können wir sagen, dass die selektive Hemmung von FXa während der CVB3-induzierten Myokarditis die

linksventrikuläre Herzfunktion verbessert. Die Aufklärung der genauen Mechanismen erfordern jedoch weitere Studien.

4.2 Rolle von PAR1 im Rahmen der CVB3-induzierten Myokarditis

In der zweiten Studie untersuchten wir die Rolle des Rezeptors PAR1 am murinen Myokarditismodell. Dabei wurde bei den PAR1^{-/-}-Mäusen an Tag 28 *p.i.* eine signifikant schlechtere Herzfunktion und eine Zunahme der linksventrikulären Dilatation gegenüber den WT-Mäusen festgestellt (**Tabelle 4-2**).

Tabelle 4-2 Dargestellt sind die Echokardiographie (EKG)-Parameter der Herzfunktion von CVB3-infizierten WT- sowie von PAR1^{-/-}-Mäusen am Tag 28 *p.i.*. LVID = linksventrikulärer Innendurchmesser, s = systolic, EF = Ejektionsfraktion, FS = fractional shortening, LV-Vol = linksventrikuläres Volumen. Die statistische Auswertung erfolgte mittels 2-Way ANOVA (Mittelwert ± SEM; * = p<0,05 vs WT; n = 5-9 Mäuse/Gruppe). In Anlehnung an Antoniak *et al* (2).

| Tag 28 | EKG | WT | PAR1 ^{-/-} |
|--------|---------------|--------------|---------------------|
| | LVID-s [mm] | 1,39 ± 0,05 | 1,84 ± 0,19* |
| | EF [%] | 79,12 ± 1,31 | 69,61 ± 3,24* |
| | FS [%] | 45,97 ± 1,33 | 38,24 ± 2,27* |
| | LV-Vol-s [µl] | 5,32 ± 0,5 | 11,29 ± 3,24* |

Darüber hinaus war das Herzgewebe der PAR1^{-/-} Mäuse 8 Tage *p.i.* stärker von CD68-positiven Zellen infiltriert als das von den entsprechenden WT-Mäusen (2). Dies ist in **Abbildung 4** veranschaulicht.

Die Infektion mit CVB3 führt im Herzen zur Entzündung des Gewebes und zur Infiltration von Immunzellen (16). Die Ergebnisse der Studie zeigten bei PAR1^{-/-}-Mäusen 8 Tage *p.i.* eine sehr viel ausgeprägte Infektion als bei den entsprechenden WT-Mäusen. Dies äußert sich in einer vermehrten Infiltration von CD68-positiven Immunzellen und in einem erhöhten CVB3-Virustiter (**Abbildung 4**) sowie in einer Verschlechterung der Herzfunktion (**Tabelle 4-2**).

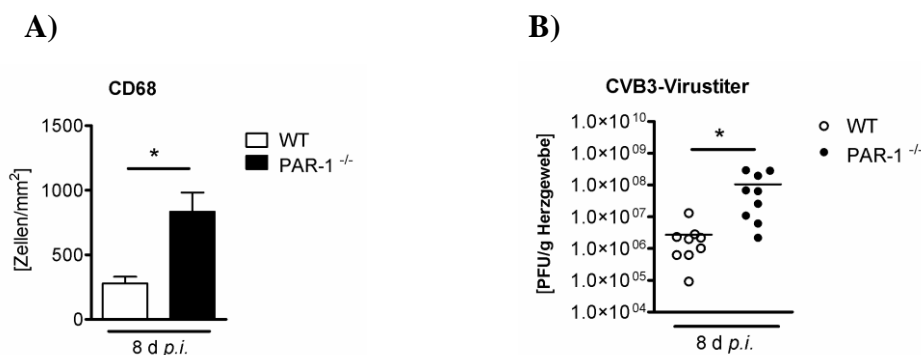


Abbildung 4: Dargestellt sind **A)** die quantitative Auswertung der immunhistologischen Färbung von CD68-positiven Zellen und **B)** der Bestimmung des Virustiters PFU/g im Herzgewebe von infizierten WT- (in weiß) und PAR1^{-/-}-Mäusen (in schwarz) 8 Tage *p.i.*. Die Daten wurden mittels *zweiseitigem Student t-Test* statistisch analysiert (Mittelwert ± SEM; * = p<0,05 vs WT; n = 4-10 Mäuse/Gruppe). In Anlehnung an Antoniak *et al* (2).

Mäuse mit einer kardiomyozyten-spezifischen Überexpression an PAR1 waren, verglichen mit WT-Mäusen gegen die virale Infektion geschützt (Daten nicht dargestellt). Antoniak *et al.* haben nachgewiesen, dass eine virale Infektion zur Erhöhung der Proteinexpression von TF und zu einer vermehrten Fibrinablagerung im Herzen infolge der Immunezellinfiltration führt (16). In der vorliegenden Studie war die Inhibition von TF oder von Thrombin in WT-Mäusen mit einer Erhöhung der Viruslast und einer verstärkten, myokardialen Schädigung assoziiert. Diese Ergebnisse legen nahe, dass dem TF/Thrombin/PAR1 Signalweg eine protektive Rolle im Rahmen der CVB3-induzierten Myokarditis zukommt.

Bemerkenswert ist zudem, dass die CVB3-induzierte Myokarditis in PAR1^{-/-}-Mäusen sehr viel schwerer ausfällt, als in mit TF- oder Thrombin-Inhibitor behandelten WT-Mäusen (Daten nicht dargestellt). Versuche mit dem MMP-13-Inhibitor WAY170523 an CVB3-infizierten WT-Mäusen ergaben eine ähnliche Verschlechterung des Krankheitsbildes gegenüber entsprechenden Kontrolltieren. Dies lässt vermuten, dass auch andere Proteasen wie MMPs während der CVB3-Infektion PAR1 im Herzen aktivieren.

4.3 Überexpression von alternativ-gesplictem Tissue Factor ruft pro-angiogenes und pro-migratorisches Verhalten in murinen kardiomyozytären HL-1 Zellen hervor

In der dritten Studie wurden die Auswirkungen der Überexpression von alternativ-gesplictem (as)TF in murinen kardiomyozyten-ähnlichen HL-1 Zellen hinsichtlich ihres pro-angiogenen und pro-migratorischen Potentials untersucht. TF, der Initiator der Koagulationskaskade, wird aufgrund alternativen Splicens in zwei Isoformen, der membrangebundene “full length” (fl)TF- und der löslichen asTF-Form, exprimiert (8). Die flTF-Form stellt dabei die thrombogenere Splice-Variante des TF dar (17). Auch wenn die Funktion von asTF bislang nur wenig untersucht ist, wird vermutet, dass asTF die Proliferation von Zellen und die Angiogenese von Blutgefäßen während der embryonalen Entwicklung des Herzens begünstigt (18). Beide Prozesse werden durch aktive Biomoleküle wie dem Fibroblasten-Wachstumsfaktor „Fibroblast growth factor-2“ (FGF2) und dem Angiogenese-Induktor „Cysteine-rich 61“ (Cyr61) verstärkt. Ziel dieser Studie war es die Auswirkungen von überexprimiertem asTF in murinen, kardiomyozytären HL-1 Zellen hinsichtlich deren pro-angiogenen und pro-migratorischen Potentials auf monozytäre Zellen hin zu untersuchen. Die Überexpression von murinem asTF in HL-1 Zellen resultierte in einer Verstärkung der proliferativen und pro-angiogenen Eigenschaften. Der Zellkulturüberstand der asTF-überexprimierenden HL-1 Zellen bewirkte zudem die Chemotaxis monozytärer Zellen.

Die Überexpression von asTF in murinen kardiomyozytären HL-1 Zellen geht mit der erhöhten mRNA-Expression der pro-angiogenen und pro-migratorischen Faktoren FGF2 und Cyr61 einher. Weiterhin beobachteten wir, dass die Überexpression von asTF eine signifikante Steigerung der Che-

motaxis monozytärer THP-1 Zellen zur Folge hat. asTF trägt somit möglicherweise positiv zur Generierung neuer Blutgefäße und zur Migration von Monozyten nach einem Herzinfarkt bei.

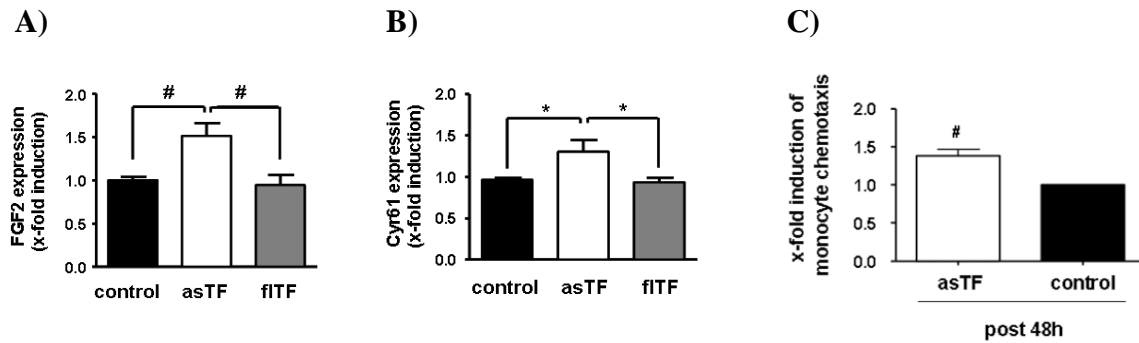


Abbildung 5: Dargestellt sind die mRNA-Expressionslevel von **A)** Fibroblast growth factor-2 (FGF2) und **B)** Cysteine- rich 61 (Cyr61) in HL-1 Zellen mit stabiler Überexpression von asTF (in weiß) und von flTF (in grau) sowie mit dem Leervektor transfizierten Kontrollzellen (in schwarz). In **C)** ist die x-fache Induktion der Chemotaxis von THP-1 Zellen, welche mit Zellkulturüberstand von asTF-überexprimierenden HL-1 Zellen (in weiß) bzw. mit Überstand der entsprechenden Kontrollzellen mit stabil transfiziertem Leervektor (in schwarz) behandelt wurden illustriert. Die Daten wurden mittels *Student t-Test* statistisch analysiert (Mittelwert \pm SEM; * = $p < 0,05$ und # = $p < 0,01$ vs control; $n = 3$). Abbildung in Anlehnung an Eisenreich *et al.* (19).

5 Literatur

1. Weithauser A, Bobbert P, Antoniak S, Böhm A, Rauch BH, Klingel K, et al. Protease-activated receptor 2 regulates the Innate Immune Response to Viral Infection in CVB3-induced Myocarditis. *Journal of the American College of Cardiology*. 2013;in press.
2. Antoniak S, Owens AP, 3rd, Baunacke M, Williams JC, Lee RD, Weithauser A, et al. PAR-1 contributes to the innate immune response during viral infection. *The Journal of clinical investigation*. 2013;123(3):1310-22. Epub 2013/02/09.
3. Borensztajn K, Peppelenbosch MP, Spek CA. Factor Xa: at the crossroads between coagulation and signaling in physiology and disease. *Trends in molecular medicine*. 2008;14(10):429-40. Epub 2008/09/09.
4. Antoniak S, Pawlinski R, Mackman N. Protease-activated receptors and myocardial infarction. *IUBMB life*. 2011;63(6):383-9. Epub 2011/03/26.
5. Takeda Y, Uemura S, Iwama H, Imagawa K, Nishida T, Onoue K, et al. Treatment with recombinant placental growth factor (PIGF) enhances both angiogenesis and arteriogenesis and improves survival after myocardial infarction. *Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society*. 2009;73(9):1674-82. Epub 2009/07/16.
6. Katsumoto M, Shingu T, Kuwashima R, Nakata A, Nomura S, Chayama K. Biphasic effect of HMG-CoA reductase inhibitor, pitavastatin, on vascular endothelial cells and angiogenesis. *Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society*. 2005;69(12):1547-55. Epub 2005/11/26.
7. Grote K, Salguero G, Ballmaier M, Dangers M, Drexler H, Schieffer B. The angiogenic factor CCN1 promotes adhesion and migration of circulating CD34+ progenitor cells: potential role in angiogenesis and endothelial regeneration. *Blood*. 2007;110(3):877-85. Epub 2007/04/13.
8. Rauch U, Nemerson Y. Circulating tissue factor and thrombosis. *Current opinion in hematology*. 2000;7(5):273-7. Epub 2000/08/29.
9. Szotowski B, Goldin-Lang P, Antoniak S, Bogdanov VY, Pathirana D, Pauschinger M, et al. Alterations in myocardial tissue factor expression and cellular localization in dilated cardiomyopathy. *Journal of the American College of Cardiology*. 2005;45(7):1081-9. Epub 2005/04/06.
10. Hobbs JE, Zakarija A, Cundiff DL, Doll JA, Hymen E, Cornwell M, et al. Alternatively spliced human tissue factor promotes tumor growth and angiogenesis in a pancreatic cancer tumor model. *Thrombosis research*. 2007;120 Suppl 2:S13-21. Epub 2007/11/21.
11. Li J, Leschka S, Rutschow S, Schwimmbeck PL, Husmann L, Noutsias M, et al. Immunomodulation by interleukin-4 suppresses matrix metalloproteinases and improves cardiac function in murine myocarditis. *European journal of pharmacology*. 2007;554(1):60-8. Epub 2006/11/23.

12. Marchant D, McManus BM. Matrix metalloproteinases in the pathogenesis of viral heart disease. *Trends in cardiovascular medicine*. 2009;19(1):21-6. Epub 2009/05/27.
13. Westermann D, Savvatis K, Lindner D, Zietsch C, Becher PM, Hammer E, et al. Reduced degradation of the chemokine MCP-3 by matrix metalloproteinase-2 exacerbates myocardial inflammation in experimental viral cardiomyopathy. *Circulation*. 2011;124(19):2082-93. Epub 2011/10/12.
14. Matsusaka H, Ikeuchi M, Matsushima S, Ide T, Kubota T, Feldman AM, et al. Selective disruption of MMP-2 gene exacerbates myocardial inflammation and dysfunction in mice with cytokine-induced cardiomyopathy. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2005;289(5):H1858-64. Epub 2005/06/07.
15. Antoniak S, Rojas M, Spring D, Bullard TA, Verrier ED, Blaxall BC, et al. Protease-activated receptor 2 deficiency reduces cardiac ischemia/reperfusion injury. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2010;30(11):2136-42. Epub 2010/08/21.
16. Antoniak S, Boltzen U, Riad A, Kallwellis-Opara A, Rohde M, Dorner A, et al. Viral myocarditis and coagulopathy: increased tissue factor expression and plasma thrombogenicity. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2008;45(1):118-26. Epub 2008/05/23.
17. Szotowski B, Antoniak S, Poller W, Schultheiss HP, Rauch U. Procoagulant soluble tissue factor is released from endothelial cells in response to inflammatory cytokines. *Circulation research*. 2005;96(12):1233-9. Epub 2005/05/28.
18. Bogdanov VY, Kirk RI, Miller C, Hathcock JJ, Vele S, Gazdaru M, et al. Identification and characterization of murine alternatively spliced tissue factor. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2006;4(1):158-67. Epub 2006/01/18.
19. Eisenreich A, Boltzen U, Malz R, Schultheiss HP, Rauch U. Overexpression of alternatively spliced tissue factor induces the pro-angiogenic properties of murine cardiomyocytic HL-1 cells. *Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society*. 2011;75(5):1235-42. Epub 2011/03/11.

6 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Ronny Malz, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Der Einfluss der Inhibition von Faktor Xa auf die myokardiale Inflammation und die linksventrikuläre Pumpfunktion im Rahmen einer Coxsackievirus B3-induzierten Kardiomyopathie“ 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 den ausgewählten Publikationen 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.“

Berlin, den 29. September 2014

Datum

Unterschrift

Anteilerklärung an den erfolgten Publikationen

Ronny Malz hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1: Malz R, Weithäuser A, Tschöpe C, Schultheiss HP, Rauch U. Inhibition of coagulation factor Xa improves myocardial function during CVB3-induced myocarditis. Cardiovasc Ther. 2014

Beitrag im Einzelnen: Durchführung der tierexperimentellen Studie, immunhistochemische Färbungen, RNA-Extraktion, Reverse Transkriptase, mRNA-Quantifizierung, Anti-FXa Aktivität Assay, Zymographie zum Nachweis der MMP-Aktivität

Publikation 2: Antoniak S, Owens AP 3rd, Baunacke M, Williams JC, Lee RD, Weithäuser A, Sheridan PA, Malz R, Luyendyk JP, Esserman DA, Trejo J, Kirchhofer D, Blaxall BC, Pawlinski R, Beck MA, Rauch U, Mackman N. PAR-1 contributes to the innate immune response during viral infection. J Clin Invest. 2013

Beitrag im Einzelnen: Quantifizierung immunhistochemischer Färbungen

Publikation 3: Eisenreich A, Boltzen U, Malz R, Schultheiss HP, Rauch U. Overexpression of alternatively spliced tissue factor induces the pro-angiogenic properties of murine cardiomyocytic HL-1 cells. Circ J. 2011

Beitrag im Einzelnen: Durchführung von WesternBlots

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

7 Lebenslauf

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

8 Publikationsliste

Originalarbeiten

“Inhibition of coagulation factor Xa improves myocardial function during CVB3-induced myocarditis”

Malz R, Weithäuser A, Tschöpe C, Schultheiss HP, Rauch U.

Cardiovasc Ther. 2014 Jun;32(3):113-9. doi: 10.1111/1755-5922.12069.

“PAR-1 contributes to the innate immune response during viral infection”

Antoniak S, Owens AP 3rd, Baunacke M, Williams JC, Lee RD, Weithäuser A, Sheridan PA, Malz R, Luyendyk JP, Esserman DA, Trejo J, Kirchhofer D, Blaxall BC, Pawlinski R, Beck MA, Rauch U, Mackman N.

J Clin Invest. 2013 Mar 1;123(3):1310-22. doi: 10.1172/JCI66125. Epub 2013 Feb 8.

„Overexpression of alternatively spliced tissue factor induces the pro-angiogenic properties of murine cardiomyocytic HL-1 cells”

Eisenreich A, Boltzen U, Malz R, Schultheiss HP, Rauch U.

Circ J. 2011;75(5):1235-42. Epub 2011 Mar 7.

“Role of the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway in regulating alternative splicing of tissue factor mRNA in human endothelial cells”

Eisenreich A, Malz R, Pepke W, Ayril Y, Poller W, Schultheiss HP, Rauch U.

Circ J. 2009 Sep;73(9):1746-52. Epub 2009 Jul 13.

Beiträge zu Fachtagungen und Kongressen

„Synthesis and characterization of selective sensor nanoparticles for magnetic resonance imaging”

Nordmeyer D, Stumpf P, Gröger D, Paulus F, Haag R, Semisch A, Richter C, Hartwig A, Dervedde J, Malz R, Rauch-Kröhnert U, Schnorr J, Gemeinhardt I, Taupitz M, Graf C, Rühl E. (2012)

111. Hauptversammlung der Deutschen Bunsengesellschaft für Physikalische Chemie e.V., (17.-19. Mai 2012, Leipzig, Deutschland.

„Inhibition of coagulation factor Xa improves left ventricular function during CVB3-induced myocarditis”

Malz R, Becher PM, Westermann D, Schultheiss HP, Rauch U. (2012)

78. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie – Herz- und Kreislaufforschung e.V. (DGK), (11.-14. April 2012, Mannheim, Deutschland)

“The deficiency of Protease Activated Receptor 2 (PAR2) protects mice from Coxsackie virus B3 (CVB3) induced myocarditis”

Weithaeuser A, Malz R, Savvatis K, Schultheiss HP, Rauch U. (2012)

78. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie – Herz- und Kreislaufforschung e.V. (DGK), (11.-14. April 2012, Mannheim, Deutschland)

„Cardiomyocyte-specific Tissue Factor *knock out* attenuates myocardial inflammation during CVB3-induced myocarditis”

Malz R, Antoniak S, Schultheiss HP, Rauch U. (2012)

78. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie – Herz- und Kreislaufforschung e.V. (DGK), (11.-14. April 2012, Mannheim, Deutschland)

„Synthesis and characterization of selective sensor nanoparticles for magnetic resonance imaging”

Nordmeyer D, Stumpf P, Gröger D, Paulus F, Haag R, Semisch A, Richter C, Hartwig A, Dervede J, Malz R, Rauch-Kröhnert U, Schnorr J, Gemeinhardt I, Taupitz M, Graf C, Rühl E. (2012)

76. Jahrestagung der Deutschen Physikalischen Gesellschaft (DPG) (25.-30. März 2012, Berlin, Deutschland)

“The deficiency of Protease Activated Receptor 2 (PAR2) impairs the genesis of Coxsackie virus B3 (CVB3) induced myocarditis”

Weithaeuser A, Malz R, Kamprath K, Savvatis K, Schultheiss HP, Rauch U. (2012)

56. Jahrestagung der Gesellschaft für Thrombose- und Hämostaseforschung (GTH) (1.-4. Februar 2012, St. Gallen, Schweiz)

„Inhibition of coagulation factor Xa in inflammatory cardiomyopathy”

Malz R, Schultheiss HP, Rauch U. (2012)

56. Jahrestagung der Gesellschaft für Thrombose- und Hämostaseforschung (GTH) (1.-4. Februar 2012, St. Gallen, Schweiz)

„Synthesis and characterization of selective sensor nanoparticles for magnetic resonance imaging”

Nordmeyer D, Stumpf P, Gröger D, Paulus F, Haag R, Semisch A, Richter C, Hartwig A, Dervedde J, Malz R, Rauch-Kroehnert U, Schnorr J, Gemeinhardt I, Taupitz M, Graf C, Rühl E. (2011)

International Conference on Biological Responses to Nanoscale Particles, (11.-15. September 2011, Essen, Deutschland)

”Anti-Apoptotic Effects of Alternatively Spliced Murine Tissue Factor in TNF- α -Induced Cardiomyocytes”

Eisenreich A, Boltzen U, Malz R, Schultheiss HP, Rauch U (2011)

International Symposium on Novel Cardiovascular Therapies Based on the Modulation of Cell Migration and Cell Differentiation, Sonderforschungsbereich Transregio 19 (SFB TR19), (3.-5. Februar 2011, Berlin, Deutschland)

9 Danksagung

Zu allererst bedanke ich mich bei Frau Prof. Dr. Ursula Rauch-Kröhnert für die Überlassung der interessanten Aufgabenstellung, für die gute Betreuung während der Dissertation und für ein freies wissenschaftliches Arbeiten.

Allen Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe möchte ich meinen herzlichen Dank für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die interessanten Diskussionen sowie die gegenseitige Anteilnahme aussprechen. Im Einzelnen gilt dieser Franziska und Kerstin für ihren technischen und persönlichen Beistand, Ulrike und Andreas für die geduldige und überaus kompetente Einarbeitung zu Beginn der Arbeit und Silvio für die inspirierende Zusammenarbeit im Rahmen verschiedener tierexperimenteller Studien. Der größte Dank gebührt meiner treuen Wegbegleiterin Alice für das Korrekturlesen dieser Arbeit, für ihre immerwährende Hilfsbereitschaft über die gesamte Zeit meiner Promotion. Weiterhin möchte ich mich bei den Ärzten unserer Arbeitsgruppe Yunus, Caroline und Peter bedanken.

Der Arbeitsgruppe Tschöpe/Westermann bin ich zu großem Dank verpflichtet, insbesondere Kerstin und Herrn Zingler für ihre fortwährende technische Unterstützung, bei Matthias für die ausgezeichnete Zusammenarbeit im Tierstall sowie bei Christin, Nadine, Diana, Moritz, Kathleen, Katrin und Kostas für die gemütlichen Geburtstagsrunden.

Bei Alex bedanke ich mich für den regen fachlichen Austausch und für den ein oder anderen lustigen Abend bei Bier und Rock´n´Roll.

Ein großer Dank geht an Susan, die mir bei der sprachlichen Gestaltung dieser Arbeit zur Seite stand.

Darüber hinaus danke ich meinen Freunden, besonders Boris, Kat, Anny und Julie für die fortwährende Motivation und die großartige Zeit außerhalb der Charite.

Abschließend danke ich meiner Familie, meinem Bruder Daniel und vor allem meinen Eltern, die mich immer und in allen Lagen unterstützt haben. Ohne sie wäre weder mein Studium noch diese Dissertation möglich gewesen.

10 Ausdruck ausgewählte Publikation 1

“Inhibition of coagulation factor Xa improves myocardial function during CVB3-induced myocarditis”

Malz R, Weithäuser A, Tschöpe C, Schultheiss HP, Rauch U.

Cardiovasc Ther. 2014 Jun;32(3):113-9. doi: 10.1111/1755-5922.12069.

<http://dx.doi.org/10.1111/1755-5922.12069>

11 Ausdruck ausgewählte Publikation 2

“PAR-1 contributes to the innate immune response during viral infection”

Antoniak S, Owens AP 3rd, Baunacke M, Williams JC, Lee RD, Weithäuser A, Sheridan PA, Malz R, Luyendyk JP, Esserman DA, Trejo J, Kirchhofer D, Blaxall BC, Pawlinski R, Beck MA, Rauch U, Mackman N.

J Clin Invest. 2013 Mar 1;123(3):1310-22. doi: 10.1172/JCI66125. Epub 2013 Feb 8.

<http://dx.doi.org/10.1172/JCI66125>

12 Ausdruck ausgewählte Publikation 3

„Overexpression of alternatively spliced tissue factor induces the pro-angiogenic properties of murine cardiomyocytic HL-1 cells”

Eisenreich A, Boltzen U, Malz R, Schultheiss HP, Rauch U.

Circ J. 2011;75(5):1235-42. Epub 2011 Mar 7.

<http://dx.doi.org/10.1253/circj.CJ-10-0783>