

## I. Einleitung

Die humane Myokarditis ist definiert als ein pathologischer Prozeß, der histologisch durch charakteristische inflammatorische Infiltrate des Myokards mit Nekrosen und / oder Degeneration der umliegenden Myozyten gekennzeichnet ist, die nicht typisch für ischämische Schäden bei der koronaren Herzerkrankung sind.

Die inflammatorische Kardiomyopathie ist definiert als Myokarditis im Zusammenhang mit kardialer Dysfunktion und wird durch etablierte histologische und spezielle immunhistologische Techniken diagnostiziert <sup>(30;125)</sup>. Der zeitliche Verlauf sowie Art und Schwere der klinischen Symptomatik sind äußerst variabel und korrelieren darin oft nicht mit sonstigen Befunden, insbesondere dem subjektiven Empfinden der Patienten. Die Myokarditis kann klinisch eine große Palette kardialer Symptomatik imitieren, so sind bei akuten Verläufen anfängliche Verwechslungen mit Myokardinfarkten beschrieben worden <sup>(128;139)</sup>, andere Patienten mit subklinischem Verlauf wiederum zeigten die meiste Zeit nur Zeichen einer leichten Erkältung.

Eine Myokarditis kann z.B. ausgelöst werden durch allergische Reaktionen, Medikamentengebrauch und -mißbrauch, verschiedenste Infektionen, wobei in den allermeisten Fällen das eigentliche pathologische Agens bis heute nur unzureichend geklärt ist.

Ebenfalls nicht geklärt ist der Zusammenhang zwischen der Myokarditis und der idiopathischen dilatativen Kardiomyopathie (IDCM). Per definitionem ist die IDCM eine Erkrankung unklarer Ätiologie, doch wird zunehmend in den letzten Jahren von einigen Autoren über die Möglichkeit diskutiert, daß die DCM ein Folgestadium des chronifizierten Verlaufes der humanen Myokarditis darstellt <sup>(3;86;119;133;152;153)</sup>.

Durch den Einsatz immunhistologischer Arbeitstechniken, speziell monoklonaler Antikörper gegen lymphozytäre Oberflächenantigene, konnte in Endomyokardbiopsien von Patienten mit DCM ähnlich häufig ein inflammatorisches Geschehen

dort nachgewiesen werden, wo histologische Routinemethoden nicht in der Lage waren relevante zelluläre Infiltrate nachzuweisen <sup>(126)</sup> .

Die Befunde zahlreicher Untersuchungen der letzten Jahre <sup>(2; 117;134;140;141;149)</sup> weisen auf eine virale Ätiologie bei der humanen Myokarditis hin.

So wird z.B. unter anderen den Influenza-A- und -B-Viren, Adenoviren, Flaviviren, dem Zytomegalievirus und dem EBV-Virus eine ätiologische Bedeutung für die Krankheitsentwicklung zugemessen, ohne dass, außer in einzelnen wenigen Fällen, eine Anzüchtung des Virus aus dem Myokard erfolgreich war.

Am häufigsten jedoch werden Virus-Myokarditiden im Zusammenhang mit Enterovirus-Infektionen beschrieben <sup>(2)</sup>. Aufgrund von mehreren epidemiologischen und diagnostischen Hinweisen werden allen voran neben ECHO-Viren Coxsackie-B-Viren als mögliche Erreger vermutet <sup>(1;2;125;141)</sup> .

So gelang es in den letzten Jahren vermehrt mit Hilfe von molekularbiologischen Methoden enterovirale RNA direkt im Myokard nachzuweisen <sup>(125)</sup>. In unterschiedlichen Arbeitsgruppen konnte bei 18 - 53% der Patienten mittels In-situ-Hybridisierung <sup>(1)</sup> und Polymerase-Ketten-Reaktion <sup>(4;125)</sup> Enterovirus-Genom in Endomyokardbiopsien nachgewiesen werden. Schon sehr früh konnten epidemiologische Studien auf Grund einer steigenden Inzidenz von Myokarditiden, die unmittelbar auf das endemisches Auftreten von Coxsackie-B-Infektionen folgten, einen solchen Zusammenhang vermuten lassen <sup>(2)</sup>.

Verschiedene neuere Untersuchungen deuten neben der Bedeutung von Coxsackie-Viren als ätiologischem Faktor darauf hin, daß eine pathologische Immunantwort des Organismus am Entstehen der Krankheit beteiligt ist, bei der es zu einem durch Virusinfektion induzierten Verlust der Selbsttoleranz mit nachfolgender so getriggelter Autoaggression gegen myokardiale Strukturen via zellulärer und humoraler Faktoren kommen könnte <sup>(3;119;144)</sup>. Diese Überlegungen stützen sich auf die Beobachtung von Autoimmunphänomenen bei Patienten mit Myokarditis und / oder IDCM. So wurden z.B. bei Patienten mit Myokarditis und auch DCM im Bereich des zellulären Immunsystems eine bis zu zehnfach erhöhte Expression von MHC-Klasse I und II-Molekülen und von Adhaesionsmolekülen im Myokard und dort hauptsächlich entlang der Zelloberfläche von Myozyten und am Endothel gefunden <sup>(9)</sup>. Diese Zeichen einer Immunreaktion zeigen sich unabhängig von der Anwesenheit

enteroviraler Sequenzen sowohl in den Herzen mit MC als auch in solchen mit DCM. In 87% der Fälle mit Myokarditis wurde eine gegen das Myokard gerichtete Sensibilisierung von peripheren Lymphozyten beschrieben, bei der ein Teil eine herzmuskelspezifische zytotoxische Immunantwort zeigte <sup>(11; 7)</sup>. Ferner fand sich eine signifikante Erhöhung von aktivierten B- und T-Lymphozyten im peripheren Blut von Myokarditis-Patienten <sup>(6; 12; 102)</sup>, wie sie auch bei der Rheumatoiden Arthritis (RA), der Primär Biliären Zirrhose (PBC) und dem Systemischen Lupus Erythematoses (SLE) gefunden wurde.

In vorangegangenen Arbeiten der letzten Jahre konnte zunehmend die wichtige Rolle der Interleukine 6 <sup>(52; 80; 53; 55; 57; 58; 127)</sup> und 8 <sup>(60; 50; 51; 150)</sup> und des solublen Interleukin-2-Rezeptors <sup>(59; 85)</sup> als regulierende Faktoren für das Wachstum <sup>(56)</sup> und die gegenseitige Differenzierung und Aktivierung der peripheren Blutlymphozyten gezeigt werden, dabei wurde neben anderen Autoimmunerkrankungen insbesondere die Rolle der Interleukine 6 <sup>(81; 82; 118)</sup> und 8 <sup>(93; 94)</sup> bei der Rheumatoiden Arthritis und der Autoimmunthyreoditis <sup>(122)</sup> untersucht. Badolato und Oppenheim konnten zeigen, daß neben anderen proinflammatorischen Zytokinen die Konzentrationen der Interleukine 6 und 8 in der Synovialflüssigkeit der Gelenke von an Rheumatoider Arthritis erkrankten Patienten im Vergleich zu einer Kontrollgruppe signifikant erhöht sind und daß deren Blutkonzentration mit der Schwere der Erkrankung korreliert <sup>(123)</sup>. Matsuno und Mitarbeiter konnten zeigen, daß die Injektion rekombinanter anti-human-IL-6-Rezeptor-Antikörper in SCID-Mäuse, denen Synovialgewebe von Patienten mit Rheumatoider Arthritis eingepflanzt worden war, zu einem signifikanten Abfall peripher im Blut zirkulierender inflammatorischer Zellen und damit zu einem Rückgang der Synovitis und zu einer verminderten Osteoklastenaktivität führt <sup>(83)</sup>. Für die inflammatorische Kardiomyopathie gibt es entsprechende Untersuchungen bisher kaum <sup>(132)</sup>.

Der s-IL-2-R wird spezifisch von T-Lymphozyten bei deren Aktivierung ins Serum abgegeben, seine Expression wird neben derer anderer Zytokine auch von IL-6 induziert. IL-6 ist wesentlich beteiligt an der Aktivierung und Proliferation sowohl von B-Lymphozyten als auch von T-Lymphozyten -hier besonders der zytotoxischen T-Zellen- und der Differenzierung bzw. Reifung der B-Zellen zu Antikörper-produzierenden Plasmazellen. IL-8 ist ein wichtiges Chemotaktikum für Monozyten/Makrophagen

und für T-Lymphozyten. T-Lymphozyten -sowohl CD4<sup>+</sup> als auch CD8<sup>+</sup>- reagieren bezüglich der chemotaktischen Antwort auf IL-8 ca. 10-fach sensitiver als andere Leukozyten. Gut untersucht ist bei der Wirkung von IL-8 die Verstärkung der Adhärenz von Leukozyten zu Endothelien als Voraussetzung für die Migration ins Interstitium.

Im Vergleich zu anderen Herzerkrankungen oder gesunden Patienten ließen sich im Bereich des humoralen Immunsystems bei einem signifikant erhöhten Prozentsatz von Patienten mit Myokarditis und dilatativer Kardiomyopathie Autoantikörper gegen eine ganze Reihe verschiedenster herzmuskelspezifischer Antigene demonstrieren <sup>(19;138;145;147)</sup>. Es wurden z.B. Antikörper gegen das Myolemm und Sarkolemm <sup>(13)</sup>, gegen Aktin und Myosin <sup>(14;131;143;148)</sup>, Endothelzellen <sup>(15)</sup>, Laminin <sup>(16)</sup>, die Sarkosin-dehydrogenase <sup>(17)</sup>, den β-adrenergen Rezeptor <sup>(5; 18)</sup>, Herzmuskelantigene bislang unbekannter Natur <sup>(19)</sup> sowie den Adenin-Nukleotid-Translokator (ANT) der inneren Mitochondrienmembran <sup>(20)</sup> beschrieben.

Der ANT <sup>(40)</sup> kommt in der inneren Mitochondrienmembran von aerob lebenden Eukaryontenzellen vor. Seine Aufgabe ist es, das in den Mitochondrien synthetisierte ATP über die innere Membran zu den energieverbrauchenden Prozessen im Zytosol zu transportieren und den Rücktransport von ADP in die Mitochondrien zur Rephosphorylierung zu übernehmen, da die innere mitochondriale Membran im Prinzip für ADP und ATP impermeabel ist. Der ADP/ATP-Transport läuft dabei als 1:1- Gegen Austausch von ADP bzw. ATP ab und ist hochspezifisch für die beiden Adeninnukleotide. Der ADP/ATP-Transport bzw. -Austausch ist entsprechend den Erfordernissen des zellulären Energiebedarfs genau angepaßt, die Kontrolle erfolgt durch das Membran- bzw. Phosphorylierungspotential.

Im Serum von Patienten mit Myokarditis ließen sich Autoantikörper nachweisen, die signifikant höher im Vergleich zu Seren von Patienten mit anderen Herzerkrankungen oder gesunden Probanden an den ANT aus Herzmuskel banden <sup>(20)</sup>. Ein molekulares Mimikry ist eine mögliche Erklärung für die Entstehung solcher Antikörper, das heißt das Vorkommen gleicher Epitope auf körpereigenen Strukturen und einem Erreger, so daß gegen den Erreger gebildete Antikörper mit den körpereigenen Strukturen kreuzreagieren <sup>(39;142;151)</sup>. Es konnte für den ANT ein solches autoimmunogenes Epitop nachgewiesen werden, das mit Coxsackie-B3-

Virus kreuzreagiert<sup>(38)</sup>. Die Autoantikörper bei Patienten mit Myokarditis binden an den ANT aus Herzmuskel signifikant höher als an ANT aus Nieren- oder Lebergewebe, d.h. sie sind organspezifisch. Ferner führten die ANT-Autoantikörper in vitro zu einer Hemmung des Nukleotidtransportes an Mitochondrien und hemmten die Bindung spezifischer Liganden an den ANT<sup>(20)</sup>. Meerschweinchen, die mit isoliertem ANT immunisiert worden waren und demensprechende spezifische Antikörper gegen den ANT bildeten, zeigten einen 30-40%igen Abfall des aortalen Mitteldrucks, des Koronarflusses und des Schlagvolumens im Vergleich zu nicht immunisierten Tieren. Dabei war die externe Herzarbeit um >50% vermindert<sup>(21;124)</sup>. Die immunisierten Tiere zeigten ferner im Vergleich zu Kontrolltieren einen Abfall der mitochondrialen ADP-Konzentration und einen Anstieg des mitochondrialen ATP, so daß sich ein erhöhtes ATP/ADP-Verhältnis ergab<sup>(22)</sup>. Somit stellt der ANT ein wichtiges Autoantigen dar, dem möglicherweise eine wichtige Bedeutung bei der Pathogenese der Myokarditis zukommt.

Trotz der Demonstration dieser Autoimmunphänomene in Patienten mit MC und DCM gibt es bisher noch keine eindeutigen Beweise für die Autoimmunpathogenese dieser Krankheiten.

Durch die Arbeiten an verschiedenen Mausmodellen wurden wesentliche Erkenntnisse über die Pathogenese der Myokarditis gewonnen. So ließ sich durch Infektion mit Coxsackie-Viren in verschiedenen Mausstämmen eine Myokarditis induzieren<sup>(2;120)</sup>. Dabei konnte man den Mechanismus der Myokardschädigung in zwei Phasen aufteilen; zum ersten in eine frühe Phase, die durch eine direkte oder indirekte Zellschädigung durch den infektiösen Virus selbst gekennzeichnet ist, und zum zweiten in eine späte Phase, für die die Bildung von herzmuskelspezifischen Autoantikörpern charakteristisch ist, die aber nur bei einigen genetisch prädisponierten Stämmen auftrat<sup>(37)</sup>. Maisch und Mitarbeiter infizierten DBA/2-Mäuse mit Coxsackie-B3-Virus und untersuchten in einer Längsschnittstudie so die zeitliche Korrelation zwischen dem ersten Auftreten histologisch nachweisbarer Myokardläsionen und Störungen der linksventrikulären Funktion der Mäuseherzen<sup>(23;116)</sup>. Es ließen sich ebenfalls nach Infektion von A.SW/Sn-J-Mäusen mit dem Coxsackie-B3-Virus zirkulierende Antikörper nachweisen, die spezifisch mit dem Myokard kreuzreagierten. Ein Teil dieser Antikörper band, wie weitere Studien zeigen

konnten, an ein 30-kD-Protein aus dem Mitochondrienextrakt, ein Molekulargewicht, das dem ANT entspricht <sup>(36)</sup>. Außerdem konnte gezeigt werden, daß die Myokardschädigung in BALB/c-Mäusen bzw. A-Mäusen durch T-Lymphozyten-Depletion mit monoklonalen Antikörpern nach Infektion mit virulenten Coxsackie-B3-Viren signifikant verringert bzw. vollständig verhindert werden konnte <sup>(35)</sup>.

In weiterführenden Arbeiten war es möglich eine Myokarditis in T-Zell-defizienten, gesunden, nicht infizierten Mäusen durch Transfer von T-Lymphozyten aus Coxsackie-B3-Virus-infizierten, an Myokarditis erkrankten Mäusen zu erzeugen.

Blay et al. übertrugen so Myokarditis durch Transfer von CD4<sup>+</sup>-Zellen aus Coxsackie-B3-Virus-infizierten Mäusen in TXBM (thymektomiert, bestrahlt und mit T-Zell-depletiertem Knochenmark rekonstituiert)-Mäuse <sup>(34)</sup>. Smith et al. übertrugen Myokarditis durch Transfer von T-Lymphozyten aus Mäusen, die mit Myosin immunisiert waren, in Severe-combined-Immunodeficiency-Mäuse <sup>(24)</sup>.

Zum einen haben diese Versuche gezeigt, daß Lymphozyten für die Übertragung von muriner Myokarditis ausreichend sind. Zum anderen haben sie demonstriert, daß für die volle Induktion des klinischen Krankheitsbildes der Myokarditis eine einfache Infektion der Mäuse bei gleichzeitiger Immunsuppression nicht ausreichend ist. Die Immunpathogenese der humanen Myokarditis und DCM war jedoch weiterhin unklar, weil sich entsprechende Versuche, z.B. der Transfer von Lymphozyten, beim Menschen selbstverständlich verbieten.

1983 wurde erstmals von Bosma und Mitarbeitern die SCID-Mutation der Maus (Severe combined immunodeficiency) beschrieben <sup>(33)</sup>, ein autosomal-rezessiver Defekt, der auf dem centromeren Ende des Chromosoms 16, ca. 7cM vom Genlocus für die  $\lambda$ -Leichtkette liegt. Diese homozygote Mutation entspricht einem Defekt des VDJ-(variable-diversity-joining)-Rekombinase-Systems ohne funktionelle coding joints und führt zu einem fehlenden Gen-Rearrangement von funktionellen Antigen-Rezeptoren auf der Zelloberfläche von Lymphozyten-Vorläufer-Zellen. Hierdurch kommt es bei den T-Zell-Vorläufern zu einem fehlenden bzw. gestörten Rearrangement der alpha/beta- bzw. gamma/delta-Kette des T-Zell-Rezeptors (TCR) und bei den B-Zell-Vorläufern zu einem Fehlen zellgebundener Immunglobuline. Dies bedeutet, daß auf der Stufe, die das Gen-Rearrangement von Antigen-Rezeptoren erfor-

dert, die zunächst normale Entwicklung der T- und B-Vorläuferzellen blockiert ist <sup>(25)</sup>. Die Folge ist, daß sich Zellreihen, bei denen ein solches Rearrangement nicht erforderlich ist, ungestört entwickeln können, wobei reife und funktionsfähige T- und B-Lymphozyten aber fehlen. SCID-Mäuse besitzen so z.B. normale Mengen an NK-Zellen, deren Aktivität unbeeinträchtigt ist <sup>(32)</sup>. Sie sind pathologisch-anatomisch gekennzeichnet durch eine periphere Leukopenie mit relativer Granulozytose, Hypo- bzw. Agammaglobulinämie, Thymushypoplasie ohne lymphozytären Kortex oder Kortex-Mark-Begrenzung, eine kleine Milz mit „leeren“ Lymphknoten, kleine Lymphknoten ohne Follikelbildung und ein normales Knochenmark <sup>(26)</sup>. Weiterhin führt die SCID-Mutation zu einer, gegenüber ionisierender Strahlung, um den Faktor 2 erhöhten Sensibilität der Mäuse, die auf einem Defekt in der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen beruht <sup>(27)</sup>.

Die SCID-Maus besitzt also aufgrund des Fehlens eines spezifischen Immunsystems eine Immuntoleranz gegenüber allogenen sowie xenogenen Zellen und Geweben, da ihr die Antigen-Rezeptoren zu deren Erkennung fehlen.

Dies führte zu der Idee, die SCID-Maus mit humanen Zellen zu rekonstituieren und als in-vivo-Modell zu benutzen. Neben dem Transfer von humanen Tumoren <sup>(28)</sup> bot sich damit zum ersten Mal die Möglichkeit, ein in-vivo-Modell des humanen Immunsystems zu etablieren. Moisiw und Mitarbeiter <sup>(29)</sup> transferierten ein funktionelles humanes Immunsystem in SCID-Mäuse, indem sie periphere Blutlymphozyten (PBL`s) intraperitoneal injizierten. Die humanen PBL`s überlebten mindestens sechs Monate in den Mäusen. Die Untersucher konnten alle injizierten Zellpopulationen im Blut und in den peripheren lymphatischen Organen der SCID-Maus demonstrieren. Außerdem war es ihnen möglich humane Immunglobuline im Blut und eine spezifische humane Antikörperantwort nach Immunisierung der Tiere mit Tetanus-Toxoid nachzuweisen. Diese Entdeckungen führten zu der Überlegung, nicht nur ein normales humanes Immunsystem in die SCID-Mäuse zu transplantieren, sondern auch humane Autoimmunerkrankungen wie den Systemischen Lupus Erythematoses (SLE) <sup>(73;74;75)</sup>, die Primäre Biliäre Zirrhose (PBC) <sup>(78;79)</sup>, die Rheumatoide Arthritis (RA) <sup>(76)</sup> und den Morbus Basedow <sup>(69;70;71;72)</sup>. Es konnte durch diese Untersuchungen gezeigt werden, daß die Autoimmunphänomene der genannten Erkrankungen durch periphere Blutlymphozyten von

Patienten auf SCID-Mäuse übertragen wurden und daß in den Mäusen die von den Patienten bekannten humanen Autoantikörper gebildet wurden. Transferierte PBL`s von Patienten mit M. Basedow bildeten so anti-Schilddrüsen-Antikörper, PBL`s von Patienten mit SLE anti-nukleäre Antikörper, PBL`s von Patienten mit RA Rheumafaktoren und PBL`s von Patienten mit PBC anti-mitochondriale Antikörper. Dies ließ sich vor allem dann beobachten, wenn bei den Patienten ein hoher Antikörpertiter gegen das getestete Antigen gefunden wurde. Im Unterschied zu den humanen humoralen Autoimmunphänomenen, die sich in der SCID-Maus recht uniform reproduzieren liessen, zeigten bisherige Untersuchungen über Organmanifestationen in der SCID-Maus uneinheitliche Ergebnisse. Über entzündliche Infiltrate aus humanen T- und B-Zellen in den Portalfeldern der Leber berichten Krams und Mitarbeiter<sup>(78)</sup>, Abedi et al. dagegen konnten diese Veränderungen bei ihren Untersuchungen nicht demonstrieren<sup>(79)</sup>; Duchosal und Mitarbeiter<sup>(73)</sup> fanden SLE-typische humane Immunglobulinablagerungen in der Niere der SCID-Maus, bei Ashany et al. dagegen waren solche Beobachtungen wiederum nicht zu machen<sup>(75)</sup>. Demgegenüber wurde bisher nicht über entzündliche Gelenkveränderungen<sup>(72)</sup> oder entzündliche Veränderungen in der Schilddrüse<sup>(69;70;71;72)</sup> der SCID-Maus berichtet. In vorausgegangenen Arbeiten war gezeigt worden, daß auch die Immunphänomene der humanen inflammatorischen Kardiomyopathie in die SCID-Maus übertragen werden konnten und die humanen Zellen in den SCID-Mäusen mehr als 60 Tage persistierten<sup>(77)</sup>.

Ausgehend von den oben dargestellten Befunden sollte in dieser Arbeit untersucht werden,

1. ob sich bei den SCID-Mäusen die von den Patienten mit inflammatorischer Kardiomyopathie bekannten linksventrikulären Funktionsstörungen beobachten lassen;
2. ob diese Funktionsstörung des linken Ventrikels begleitet wird von einer Erhöhung von Autoantikörpern bzw. Zytokinen im peripheren Blut der Mäuse;
3. ob Korrelationen bestehen zwischen der Pumpfunktionsstörung und den Autoantikörpern oder den Zytokinen bzw. den zellulären Infiltraten im Myokard.