

Aus der Medizinischen Klinik für Kardiologie und Pulmologie
der Charité-Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Der Einfluss der Interleukin-6
Rezeptorblockade auf die virale Myokarditis im
murinen Tiermodell

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité-Universitätsmedizin Berlin

von

Herrn Matthias Fröhlich
aus Bielefeld

Datum der Promotion: 5. Juni 2016

MEINEN ELTERN

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV
Zusammenfassung	1
Abstract	2
1 Einleitung	3
1.1 Myokarditis als humanes Krankheitsbild	3
1.1.1 Epidemiologie	3
1.1.2 Ätiologie	4
1.1.3 Pathogenese	4
1.1.4 Klinik	5
1.1.5 Prognose	6
1.2 Coxsackieviren	8
1.3 Immunologie der viralen Myokarditis im Tiermodell	8
1.3.1 Akute Phase	9
1.3.2 Subakute Phase	9
1.3.3 Chronische Phase	14
1.4 Myokardiales Remodeling	15
1.5 Interleukin-6 (IL-6)	17
1.5.1 Die Entdeckungsgeschichte von IL-6	17
1.5.2 Das IL-6 Rezeptorsystem	18
1.5.3 Die IL-6 Signalkaskade und ihre Regulation	19
1.5.4 Die biologischen Funktionen von IL-6	21
1.5.5 IL-6 bei kardiovaskulären Erkrankungen	21
1.5.6 Blockade von IL-6 als therapeutische Option	23
2 Fragestellung der Arbeit	25
3 Material und Methoden	26
3.1 Studiendesign	26
3.2 Versuchstierhaltung	27
3.3 Infektion mit Coxsackievirus B3	27
3.4 Interleukin-6 Blockade mit Rezeptor-Antikörper	28
3.5 Messung der hämodynamischen Funktion	28
3.5.1 Konduktanzkatheter-Messtechnik	28
3.5.2 Narkose	29
3.5.3 Operationstechnik und chirurgisches Vorgehen	29
3.5.4 Erheben von Körper-, Herz- und Lungengewicht	30

3.5.5	Messung der linksventrikulären Funktion mittels Druck-Volumen-Kurven	30
3.5.6	Parameter der globalen Herzfunktion	31
3.5.7	Parameter der systolischen Herzfunktion	32
3.5.8	Parameter der diastolischen Herzfunktion	32
3.6	Histologie und Immunhistochemie	33
3.6.1	Anfertigung von Gefrierschnitten	33
3.6.2	Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung	34
3.6.3	Einordnung in den Myokarditis Score	35
3.6.4	Theoretischer Hintergrund der Immunhistochemie	35
3.6.5	Avidin-Biotin-Komplex-Methode (ABC-Methode)	38
3.6.6	EnVision™-Methode	38
3.6.7	DeadEnd™ Colorimetric TUNEL-Assay	40
3.6.8	Auswertung der histologischen Präparate	42
3.7	RNA-Aufbereitung	42
3.7.1	Extraktion von RNA aus kardialem Gewebe	44
3.7.2	Aufreinigung der RNA und DNA-Verdau	44
3.7.3	Reverse Transkription	45
3.8	Quantifizierung von RNA durch Polymerase Kettenreaktion (PCR)	45
3.8.1	Die quantitative TaqMan® PCR	46
3.9	CVB3-Infektion und Stimulation mit IL-6 in vitro	47
3.10	Statistische Auswertung	48
4	Ergebnisse	53
4.1	Schweregrad der viralen Myokarditis	53
4.2	Myokardiale Expression von IL-6 in vivo	54
4.3	Myokardiale Inflammation	57
4.3.1	Zytokinexpression im myokardialen Gewebe	57
4.3.2	Regulation von Adhäsionsmolekülen	57
4.3.3	Immunzellinfiltration	60
4.3.4	Frühe T-Zell Aktivierung	65
4.4	Kardiale Apoptose	67
4.5	Kardiales Remodeling	67
4.6	Hämodynamische Funktion	75
4.6.1	Globale Herzfunktion	75
4.6.2	Systolische Herzfunktion	75
4.6.3	Diastolische Herzfunktion	75
4.7	Versuche in Zellkultur	77
4.7.1	Expression von IL-6 und TNF- α nach CVB3-Infektion in vitro	77
4.7.2	Expression von IL-6 und TNF- α nach Stimulation mit IL-6 in vitro	77

5 Diskussion	81
5.1 Schweregrad der viralen Myokarditis	81
5.2 Myokardiale Inflammation	82
5.2.1 Zytokinexpression im myokardialen Gewebe	82
5.2.2 Regulation von Adhäsionsmolekülen	83
5.2.3 Immunzellinfiltration	83
5.2.4 Frühe T-Zell Aktivierung	84
5.2.5 Effekte von IL-6 auf kardiale Zellen	85
5.3 Kardiale Apoptose	86
5.4 Kardiales Remodeling	87
5.5 Hämodynamische Funktion	88
5.6 Methodenkritik	90
Literatur	93
Abbildungsverzeichnis	106
Tabellenverzeichnis	107
Lebenslauf	108
Publikationen	110
Anteilerklärung	111
Selbstständigkeitserklärung	113
Danksagung	114

Abkürzungsverzeichnis

ABC-Methode	Avidin-Biotin-Komplex-Methode
ABI	Applied Biosystems, Darmstadt
abs. Ethanol	absolut reinster Ethanol
ADAM	A Disintegrin And Metalloproteinase
APC	Antigen-präsentierende Zellen, <i>antigen presenting cells</i>
Aqua dest.	destilliertes Wasser, <i>aqua destillata</i>
α-SMA	α -Smooth muscle actin, <i>a-Aktin des glatten Muskelgewebes</i>
β	Ventrikelsteifigkeitskonstante
B19V	Parvovirus B19
BCGF-2	B-Zell Wachstumsfaktor 2, <i>B-cell growth factor 2 (heute IL-5)</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
BSF-1	B-Zell stimulierender Faktor 1 (<i>heute IL-4</i>)
BSF-2	B-Zell stimulierender Faktor 2 (<i>heute IL-6</i>)
CAR	Coxsackievirus und Adenovirus Rezeptor
CD	Cluster of differentiation, <i>Unterscheidungsgruppen</i>
CD8⁺-Zellen	zytotoxische T-Zellen
cDNA	komplementäre DNA, <i>complementary DNA</i>
CI	Cardiac Index, <i>Kardialer Index</i>
CLCF1	Cardiotrophin-like Cytokine Factor 1
CMV	Cytomegalie Virus
CNTF	Ziliärer neurotroper Faktor
CO	Herzzeitvolumen, <i>Cardiac Output</i>
CRP	C-reaktives Protein
C_T	Threshold-Cycle
CT-1	Cardiotrophin-1
CVB	Coxsackievirus der Gruppe B
CVB3	Coxsackievirus B3
DAF	Deflecting Decay Accelerating Factor
DCM	Dilatative Kardiomyopathie, <i>dilatative cardiomyopathy</i>
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure, <i>desoxyribunucleic acid</i>
dP/dt_{\max}	Maximale linksventrikuläre Druckanstiegsgeschwindigkeit
dP/dt_{\min}	Maximale linksventrikuläre Druckabfallsgeschwindigkeit
EAM	Experimentelle Autoimmunmyokarditis
EBV	Epstein-Barr-Virus
ECM	extrazelluläre Matrix, <i>extracellular matrix</i>
EF	Ejektionsfraktion
FAM	Fluorescein
FCS	Fetales Kälberserum, <i>fetal calf serum</i>
FRET	Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer
GCM	Riesenzellmyokarditis, <i>giant cell myocarditis</i>
gp130	Glykoprotein 130
HCV	Hepatitis-C-Virus
HE	Hämatoxylin-Eosin
HeLa	Henrietta Lacks, <i>Namensgeberin der HeLa-Zellen</i>

HLA	Humanes Leukozytenantigen
HR	Herzfrequenz, <i>heart rate</i>
HRP	Meerrettichperoxidase, <i>horseradish peroxidase</i>
HSV	Herpes-simplex-Virus
ICAM	Interzelluläres Zelladhäsionsmolekül, <i>Intercellular Adhaesion Molecule</i>
IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin der Klasse G
IL	Interleukin
IL6RAB	IL-6-Rezeptorantikörper MR16-1, <i>IL-6 receptor antibody MR16-1</i>
IL6-R	membranständiger IL-6 Rezeptor
i.p.	intraperitoneal
ISFC	Internationale Gesellschaft für Kardiologie, <i>International Society and Federation of Cardiology</i>
Jak	Janus-assoziierte Kinase
KHK	Koronare Herzkrankheit
KKV	Konduktanzkatheter-Verfahren
LaGeSo	Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin , <i>low density lipoprotein</i>
LIF	Leukämie hemmender Faktor, <i>leukemia inhibitory factor</i>
LVEDP	Linksventrikulärer enddiastolischer Druck, <i>left ventricular enddiastolic pressure</i>
LVEDV	Linksventrikuläres enddiastolisches Volumen, <i>left ventricular enddiastolic volume</i>
LVESP	Linksventrikulärer endsystolischer Druck, <i>left ventricular endsystolic pressure</i>
LVESV	Linksventrikuläre endsystolisches Volumen, <i>left ventricular endsystolic volume</i>
MAP	Mittlerer Arterieller Druck, <i>mean arterial pressure</i>
MGI-2	Makrophagen und Granulozyten Induktor Typ 2
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex, <i>major histocompatibility complex</i>
MMP	Matrix Metalloprotease
MOI	Multiplicität der Infektion, <i>multiplicity of infection</i>
MPS	Mononukleäres Phagozyten System
MRT	Magnetresonanztomographie
MW	Mittelwert
NaCl	Natriumchlorid
NIH	US Nationalinstitut für Gesundheit, <i>US National Institutes of Health</i>
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
NP	Neuropoetin
OSM	Oncostatin M
PAMPs	Pathogen assoziierte molekulare Pattern , <i>phosphat-buffer-solution</i>
PCR	Polymerase Kettenreaktion, <i>polymerase chain reaktion</i>
PFU	Plaque Forming Units
PHT	Druck Halbwertzeit, <i>pressure half time</i>
p.i.	<i>post infectionem, nach der Infektion</i>
PIAS	Protein Inhibitoren aktivierter STAT-Proteine
P_{max}	Maximaler linksventrikulärer Druck, <i>maximum Pressure</i>
PV	Druck-Volumen, <i>pressure-volume</i>
qPCR	quantitative real time PCR
R	elektrischer Widerstand
RA	rheumatoide Arthritis
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System

RACK1	Rezeptor für aktivierte Proteinkinase C
RLT	RNeasy Lyse, <i>Teil des RNeasy-Kit</i>
RNA	Ribonucleinsäure, <i>ribonucleic acid</i>
RORγt	Reinoic acid receptor-related orphan nuclear receptor γ t
RPE	RPE Puffer, <i>Teil des RNeasy-Kit</i>
RPM	Umdrehungen pro Minute, <i>Rounds pro Minute</i>
RT	Reverse Transkription
rTdT	Rekombinante Terminal Deoxynucleotidyl-Transferase
RW1	RW Puffer, <i>Teil des RNeasy-Kit</i>
S2	gentechnische Sicherheitsstufe 2
SEM	Standardfehler des Mittelwertes, <i>standard error of the mean</i>
SH2	Src-homology 2
sIL6-R	Löslicher IL-6 Rezeptor, <i>soluble IL-6 receptor</i>
Siva	Apoptose induzierender Faktor, <i>apoptosis-inducing factor</i>
SOCS	Suppressoren des Zytokinsignalings, <i>suppressors of cytokine signaling</i> , <i>saline sodium citrat</i>
STAT	Signal Transduktoren und Aktivatoren für Transkription, <i>signal transducers and activators of transcription</i>
SV	Schlagvolumen
SW	Schlagarbeit, <i>stroke work</i>
τ	Zeitkonstante der isovolumetrischen Relaxation
TAMRA	Tetramethylrhodamin
TBS	Tris-Puffer, <i>Tris-buffered saline</i>
TCR	T-Zell Rezeptor, <i>T-Cell receptor</i>
TGF-β	Transorming Growth Factor β
T_H	T-Helferzellen
TIMP	Gewebsinhibitor der MMPs, <i>tissue inhibitor of MMP</i>
TLR	Toll-like Rezeptor
T_M	T-Gedächtniszellen, <i>memory T-cells</i>
TNF-α	Tumor Nekrose Faktor α
T_{REG}	regulatorische T-Zellen
VCO	Vena-Cava-Okklusion
VPg-Protein	virales Protein, <i>viral protein genome-linked</i>
WHF	World Heart Federation
WHO	Weltgesundheitsorganisation, <i>World Health Organization</i>

Zusammenfassung

Hintergrund Die virale Myokarditis ist eine der Hauptursachen für den plötzlichen Herztod bei Patienten unter 40 Jahren. Besonders zytokingesteuerte inflammatorische Prozesse, werden in der aktuellen Forschung diesem Zusammenhang immer intensiver als ursächlich diskutiert. Interleukin-6 (IL-6) wurde sowohl in erhöhten Serumspiegeln, als auch intrakardial vermehrt bei Patienten mit Myokarditis und chronischer Herzinsuffizienz gezeigt. Die vorliegende Studie untersucht, die Auswirkungen einer IL-6 Rezeptorblockade, auf die kardiale Pumpfunktion, immunologische Mechanismen und das Remodeling nach CVB3-induzierter Myokarditis im murinen Tiermodell.

Material und Methoden C57BL6/j Mäuse wurden mit Coxsackievirus B3 (CVB3) infiziert und entwickelten in Folge eine Myokarditis. Einen Tag p.i. wurden die Tiere durch einmalige Injektion des Rezeptorantikörpers MR16-1 bzw. IgG-Kontrolle behandelt. Sieben Tage p.i. wurden alle Tiere einer hämodynamischen Messung mittels Konduktanzkatheter-Technik zugeführt. Die Inflammation sowie die antivirale Reaktion und Prozesse des kardialen Remodelings wurden durch Immunhistologie, TaqMan[®] PCR und isolierte Versuche in Zellkultur untersucht.

Ergebnisse Verglichen mit den Kontrollen, zeigten die infizierten Tiere eine deutlich kompromittierte systolische sowie diastolische Herzfunktion begleitet von einer ausgeprägten kardialen Inflammation. Die IL-6 Rezeptorblockade führte zu einem Übergang der zellulären Immunreaktion in Richtung einer T_H1 Antwort. Zusätzlich zeigte sich eine allgemein reduzierte kardiale Immunreaktion und eine verbesserte extrazelluläre Matrixregulation.

Schlussfolgerung Die IL-6 Rezeptorblockade führt durch Immunmodulation zu einer Verbesserung der linksventrikulären Pumpfunktion in der akuten Myokarditis im Mausmodell.

Abstract

Background Viral myocarditis is one of the major causes for unexpected sudden death in patients under the age of 40. Especially cytokine-driven inflammatory mechanisms are discussed to be key mechanisms of cardiac damage. Increased cardiac levels as well as increased serum levels of interleukin-6 (IL-6) have been observed in patients with acute myocarditis and are associated with poor prognosis. This study was designed to examine whether treatment with anti-IL-6 receptor antibody improves cardiac dysfunction and left ventricular (LV) remodeling in experimental coxsackievirus B3 (CVB3)-induced myocarditis.

Material and methods C57BL6/J mice were subjected to acute Coxsackievirus B3 (CVB3) infection. One day after viral infection mice were treated with a single injection of the anti-IL-6 receptor antibody (MR16-1) or IgG. Seven days after viral infection, LV function was examined by conductance catheter technique. Inflammatory and antiviral response as well as cardiac remodeling were assessed by immunohistochemistry, TaqMan[®] PCR, and isolated cell culture experiments.

Results Compared to controls, infected mice displayed an impaired systolic and diastolic LV function associated with an increase in cardiac inflammation. IL-6 receptor blockade led to a shift of the immune response to the T_H1 direction. In addition, cardiac immune response and extracellular matrix regulation improved, resulting to a preserved LV function.

Conclusion IL-6 receptor blockade exerts cardiobeneficial effects by antiviral and immunomodulatory actions in acute murine myocarditis.

1 Einleitung

1.1 Myokarditis als humanes Krankheitsbild

Myokarditis ist eine entzündliche Erkrankung des Herzmuskelgewebes, welche potentiell lebensbedrohlich verläuft, sich durch eine hohe Variabilität der Symptome auszeichnet und sowohl Kinder als auch Erwachsene betrifft. Die Myokarditis wurde 1837 zum ersten Mal von Soberheim et al. beschrieben [1]. Die Diagnose dieser Erkrankung blieb jedoch immer eine Herausforderung und konnte in den meisten Fällen nur klinisch gestellt werden. Erst moderne Untersuchungstechniken, wie die histologische Analyse von Myokardbiospien, machten eine sichere Diagnosestellung möglich. Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) und die Internationale Gesellschaft für Kardiologie (ISFC) definierten 1986 die Dallas-Kriterien um die Myokarditis histopathologisch einzuteilen. Hiernach gilt eine Myokarditis als nachgewiesen, wenn in Herzpräparaten ein zelluläres Infiltrat, begleitet von Nekrose der Kardiomyozyten, gesehen wird [2]. Die Aktualität dieser Kriterien wird jedoch vor dem Hintergrund neuerer Methoden durchaus kontrovers diskutiert [3]. Neuere histologische Kriterien schließen immunhistochemische Färbungen mit ein, die Oberflächenstrukturen wie Cluster of differentiation (CD)3, CD4, CD20, CD28 und Humanes Leukozytenantigen (HLA) nachweisen. Die aktuelle Definition der aktiven Myokarditis stammt von der World Heart Federation (WHF), die sich an den ursprünglichen Dallas-Kriterien stark orientiert. Sie fordert ein lymphozytäres Infiltrat von mehr als 14 Lymphozyten und/oder viralen Makrophagen pro mm und eine gleichzeitige Zellnekrose sowie ödematöse Veränderungen [4].

1.1.1 Epidemiologie

Aufgrund der Heterogenität der klinischen Präsentation von Myokarditiden, ist die epidemiologische Beschreibung dieses Krankheitsbildes nach wie vor schwierig. Eine genaue Prävalenz kann aufgrund der teils asymptomatischen Verläufe nicht angegeben werden [5]. Für die USA wurde jedoch eine Jahresprävalenz von acht bis zehn pro 100.000 Einwohner bestimmt [6]. Verschiedene weitere Erhebungen machen zudem die Bedeutung, die die Myokarditis gerade auch bei jungen Patienten einnimmt, klar. So wies eine groß angelegte Behandlungsstudie von Hahn et al. nach, dass 9,6% aller Patienten, die an ungeklärter dilatativer Kardiomyopathie (DCMs) verstarben, histopathologisch Zeichen einer Myokarditis hatten [7]. Eine andere Untersuchung unter Sportlern konnte zeigen, dass 6% von 1866 plötzlich verstorbenen Athleten, ebenfalls eine Myokarditis gehabt haben müssen [8]. Gupta et al. gaben eine Spanne von 4 bis 20% bei sonst jungen Erwachsenen des US-amerikanischen Militärs an, die an plötzlichem Herztod verstarben, bei denen eine Myokarditis ursächlich war [9].

1.1.2 Ätiologie

Die Myokarditis als infektiöse Erkrankung des Herzmuskelgewebes kann durch diverse Pathogene (Tabelle 1) oder Autoimmunprozesse ausgelöst werden. Die mit Abstand häufigsten Erreger der Myokarditis in der westlichen Welt sind Viren. Neben dem Hepatitis-C-Virus (HCV), Influenzaviren, Herpes-simplex-Virus (HSV), Epstein-Barr-Virus (EBV), Parvovirus B19 (B19V) und dem Cytomegalie Virus (CMV) sind Entereoviren und hier insbesondere Cocksackieviren der Gruppe B maßgeblich als Auslöser von Myokarditiden bekannt [10]. In weniger entwickelten Ländern spielen auch andere Erreger, wie Bakterien, Pilze und Protozoen eine größere Rolle, doch dies ist in Europa eher selten [11]. Tabelle 1 zeigt die möglichen Erreger von Myokarditiden.

1.1.3 Pathogenese

Die Pathogenese der viralen Myokarditis lässt sich anhand von Erkenntnissen aus tierexperimentellen Arbeiten in drei Phasen einteilen. Auf die erste Phase der Infektion mit anschließender Aktivierung des angeborenen Immunsystems folgt die postinfektiöse Phase, die geprägt ist, durch eine adaptive Immunreaktion. Die dritte Phase bildet die postinflammatorische Entwicklung, die von völliger Remission bis hin zu einer chronisch viralen Herzmuskelentzündung mit DCM reichen kann [12]. Der Kontakt mit dem Virus findet in den meisten Fällen zunächst durch Aufnahme und Ausbreitung im Magen-Darm-Trakt statt. Es folgt die Ausbreitung über das Blut und das Lymphsystem. Nach dem Eintritt des Virus in die Herzmuskelzelle, führt die intrazelluläre Replikation zu Zelluntergang und Nekrose [13]. Freiliegende Zellbestandteile, wie beispielsweise kardiales Myosin, führen zu einer unspezifischen Immunantwort des Wirtsorganismus, welche gekennzeichnet ist durch eine Inversion von Natürlichen Killerzellen und Makrophagen, gefolgt von T-Lymphozyten [14]. Diese akute Phase dauert in der Regel nur wenige Tage. Hieran schließt sich die subakute Phase an, die maßgeblich durch die adaptive Immunantwort, vermittelt durch virusspezifische T-Zellen, bestimmt ist. Zytokinaktivierung proinflammatorischer Botenstoffe wie Tumor Nekrose Faktor α (TNF- α), Interleukin (IL)-1 und -6 und spezifische Antikörper gegen virale und kardiale Proteine führen zu einer verstärkten inflammatorischen Antwort, die in Folge zu Zelluntergang von Kardiomyozyten und Einbußen in der kontraktile Funktion führen kann [15]. Die Inflammation sinkt jedoch mit fortschreitender Viruselimination und in vielen Fällen stellt sich die linksventrikuläre Funktion ohne gravierende Folgeschäden wieder ein. Manche Patienten leiden aber auch ohne Nachweis von Virusgenom lange Zeit nach einer akuten Infektion an starken Beschwerden. Diese chronische Phase wird oft begleitet von kardialen Umbauprozessen, die zu Kontraktionseinbußen führen und nicht selten in eine DCM münden [16].

Tabelle 1 – **Ursachen von Myokarditiden** Mit * gekennzeichnete Punkte stellen häufige Auslöser von Myokarditiden dar. In Anlehnung an [11].

Viren	Bakterien	Toxine	Hypersensitivität
Adenovirus*	Chlamydien	Ethanol*	Cephalosporine
Coxsackievirus B*	Vibrio cholerae	Anthrazykline*	Clozapin
Cytomegalievirus*	Mycoplasmen	Arsen	Diuretika
Humanes-Herpes-Virus 4	Neisserien	Kohlenmonoxid	Insektenstiche
Hepatitis-C-Virus	Salmonellen	Katecholamine	Lithium
Herpes-simplex-Virus	Staphylokokken	Kokain*	Sulfonamide
HIV*	Streptokokken	Schwermetalle	Schlangenbiss
Influenza Virus	Clostridium tetani	Kupfer	Tetanus Toxin
Mumps	Mykobakterien	Quecksilber	Tetrazykline
Parvovirus B19		Blei	
Poliovirus			
Rabies	Spirochäten	Protozoen	Systemische Erkrankungen
Rubella	Leptospira	Morbus Chagas	Hypereosinophiles Syndrom
Humanes-Herpes-Virus 3	Borrelia Burgdorferi	Leishmaniose	Kawasaki-Syndrom
Gelbfieber-Virus	Borrelia spp.	Malaria	Sarkoidose
	Treponema pallidum		Weger Granulomatose

1.1.4 Klinik

Die Myokarditis bietet in Hinblick auf die Symptomatik ein sehr heterogenes Bild. So können die Anzeichen von grippeähnlichen Beschwerden, die nach kurzer Zeit unbehandelt in eine Restitutio ad integrum münden, bis hin zu vital bedrohlicher kardialer Symptomatik reichen, woran sich eine schwere Kardiomyopathie anschließt, die nur durch Organ-Ersatz-Verfahren oder Transplantation das Überleben sichert [16]. Die Präsentation der akuten Myokarditis kann ähnliche Symptome wie ein Myokardinfarkt mit typischen EKG-Veränderungen, Angina pectoris-Beschwerden und Belastungsdyspnoe zeigen, doch in vielen Fällen, sind die anfänglichen Symptome der Myokarditis eher nicht kardial, sondern ähneln unspezifischen

Infektsymptomen [17]. Dies liegt darin begründet, dass vielen Herzmuskelentzündungen ein Virusinfekt der oberen Atemwege oder des Gastrointestinaltraktes voraus geht und sich in Folge kardial manifestiert. Sobald jedoch kardiale Symptome, wie die oben beschriebenen, auftreten, kann die Diagnostik meist nur noch das Ausmaß der Schädigung evaluieren und nur in wenigen Fällen noch zu einer kausalen Therapie mit durchschlagendem Erfolg beitragen. Für die Sicherung der Diagnose und der Einleitung einer gezielten Therapie, ist es unerlässlich das Myokardgewebe mikroskopisch und immunhistochemisch zu untersuchen [18, 17]. Dies setzt eine Biopsie voraus, die mittels eines diagnostischen Herzkatheters problemlos gewonnen werden kann. Aus klinischer Perspektive kann die Myokarditis in vier Formen aufgeteilt werden, welche in Tabelle 2 dargestellt sind [19].

1.1.5 Prognose

Auch die Prognose unterscheidet sich bei den verschiedenen Formen der Myokarditis stark, die frühzeitige und treffsichere Diagnose eines inflammatorischen kardialen Geschehens, bleibt jedoch maßgeblicher Prädiktor für das Outcome der Patienten [18]. Weitere prognostische Faktoren sind die klinische Präsentation bei Erstvorstellung in Bezug auf die linksventrikuläre und rechtsventrikuläre Funktion, persistierende Virusinfekte, chronische Entzündung und das Vorhandensein kardiodepressiver Autoantikörper [17]. Die fulminante Myokarditis, weist eine sehr hohe Letalität von über 40% innerhalb der initialen Phase auf, da das inflammatorische Geschehen die kardiale Funktion erheblich einschränkt. Überlebt der Patient diese Phase, so hat er eine exzellente Langzeitprognose bei zumeist vollständiger Ausheilung. Über die Hälfte der Patienten mit akuter Myokarditis sind jedoch auf Organersatzverfahren oder eine Herztransplantation angewiesen [20]. Eine ebenfalls schlechte Prognose hat das Bild der Riesenzellmyokarditis (GCM), welche mit der Entwicklung von Riesenzellen einhergeht und sich durch besonders fulminante Verläufe auszeichnet. Cooper et al zeigten, anhand eines Kollektivs von 63 Patienten, die sich mit kardialen Symptomen präsentierten, dass die GCM vor allem junge Patienten zumeist aus völliger Gesundheit heraus betrifft. Fast 90% dieser Patienten verstarben oder benötigten eine Herztransplantation. Das mittlere Überleben gemessen vom Beginn der Symptome lag lediglich bei 5,5 Monaten. Eine medikamentöse Therapie zeigte hier wenig erfolgversprechende Ergebnisse und stellte die Herztransplantation als Therapie der Wahl heraus [21].

Tabelle 2 – **Klinisch pathologische Einteilung der Myokarditiden** Aufgrund der klinischen Präsentation und basaler histologischer Untersuchungen kann die Myokarditis in vier Typen eingeteilt werden. BL = Borderline, DCM = dilatative Kardiomyopathie, LV = linksventrikulär. Modifiziert in Anlehnung an [19].

	Fulminant	Akut	Chronisch aktiv	Chronisch persistierend
Beginn kardialer Symptome	typisch	untypisch	untypisch	untypisch
Erstvorstellung	Kardiogener Schock, Schwere LV Dysfunktion	Herzinsuffizienz m. LV Dysfunktion	Herzinsuffizienz m. LV Dysfunktion	Nichtkardiale Symptome, normale LV Funktion
Erste Biopsie	Multiple Foci einer aktiven Myokarditis	Aktive oder BL Myokarditis	Aktive oder BL Myokarditis	Aktive oder BL Myokarditis
Klinischer Verlauf	Komplette Remission oder Tod	Inkomplette Remission oder DCM	Nichtkardiale Symptome, normale LV Funktion	
Histologischer Verlauf	Vollständige Auflösung der aktiven Myokarditis	Teilweise Auflösung der aktiven Myokarditis	weiterführende oder sich auflösende Myokarditis, Fibrose und Riesenzellen	weiterführende oder sich auflösende Myokarditis
Immunsupp. Therapie	Kein Benefit	Manchmal erfolgreich [22]	Erfolgreich [23]	Erfolgreich [23]

1.2 Coxsackieviren

Coxsackieviren gehören zur Gattung der Enteroviren und zur Familie der Picornaviren. Ihre Geschichte reicht zurück auf die schwere Erkrankung zweier Jungen mit Poliomyelitis, die in den 40er Jahren in der Kleinstadt Coxsackie bei New York lebten. Die Viren konnten mit den sich gerade etablierenden Methoden zum ersten Mal im Stuhl dieser Jungen nachgewiesen werden [24]. Die erste Sequenzierung des Genoms von Coxsackieviren gelang Iizuka und Kollegen 1987 [25]. Demnach handelt es sich, wie bei anderen Enteroviren auch, um ein unbehülltes einzelsträngiges positivgerichtetes RNA (ss(+)-RNA)-Virus, mit dem viralen Protein (VPg-Protein) am 5'-Ende und einem Poly-A-Schwanz am 3'-Ende [25]. Umgeben ist das Virus von einem ikosaederförmigen Capsid, welches spezifische Bindungsstellen für zelluläre Rezeptoren trägt [26]. Die Aufnahme in den Kardiomyozyten schließlich wird über den spezifischen Coxsackievirus und Adenovirus Rezeptor (CAR) vermittelt, der gemeinsam mit dem Korezeptor Deflecting Decay Accelerating Factor (DAF) einen Komplex eingeht, welcher von der Zelle internalisiert wird. Es konnte gezeigt werden, dass in Abwesenheit von CAR, eine Infektion mit CVB3 nicht stattfinden kann [27]. Ihrer Pathogenität nach lassen sich die Coxsackieviren in die Stämme A und B sowie diverse Serotypen unterteilen. Die Coxsackie-A-Viren gliedern sich in 24 Serotypen und rufen im Allgemeinen mildere Symptome hervor. Eine Infektion mit Coxsackieviren der Gruppe B hat durchaus schwerere Erkrankungen zur Folge [28] und ist im Fall von CVB3 als Auslöser einer Myokarditis-Epidemie unter Neugeborenen in Südafrika beschrieben und im Fall von CVB2 für den Ausbruch von Meningitiden verantwortlich [29, 30]. Die Gruppe umfasst insgesamt sechs Serotypen, wovon die Typen CVB1, CVB3 und CVB5 direkt kardiovirulent sind [31].

1.3 Immunologie der viralen Myokarditis im Tiermodell

Maßgebliche Erkenntnisse im Bereich der Myokarditisforschung wurden durch tierexperimentelle Arbeiten erlangt. Dies liegt nicht zuletzt daran, dass die Diagnosestellung aufgrund der Heterogenität der Symptome häufig spät oder gar nicht erfolgt. Das am weitesten verbreitete Modell zur Erforschung der Pathogenese der viralen Myokarditis ist das klassische Coxsackievirus B3 (CVB3)-Modell [12]. Eine Immunreaktion ist ein komplex organisierter Vorgang, der unter anderem dazu dient, Schädlinge, die den mechanischen Schutz der Haut überwunden haben, zu bekämpfen. Neben diesem, für das menschliche Überleben wichtigen Ziel, kann es durch diverse fehlgeleitete Prozesse in der Mustererkennung oder der Zellaktivierung, zu Immunprozessen ohne ein schädigendes Agens, den Autoimmunkrankheiten, kommen. Für die Entstehung der Myokarditis bzw. dessen Persistieren und die Entwicklung einer DCM sind Autoimmunprozesse mehrfach diskutiert worden [32, 33, 34, 35]. Im Verlauf einer myokardialen Infektion durch ein schädigendes Agens, kommt es durch Zelluntergang zur Freisetzung von Autoantigenen, wie dem kardialen Myosin, welche vom Immunsystem erkannt und im Rahmen der Autoimmunphase bekämpft werden [36, 37]. Hier zeigt sich, dass es im Rah-

men der Elimination einer Entzündung neben der Befreiung von dem schädlichen Agens auch zu relevanten Gewebeschäden kommt, die im Verlauf selbst Krankheitswert entwickeln können. Ein zentrales Element im feinregulierten Zusammenspiel diverser Zellpopulationen ist der Übergang von angeborener unspezifischer Abwehr, hin zu einer erworbenen erregerspezifischen Immunreaktion [38]. Die einzelnen Schritte dieses Vorgangs sollen hier in ihren Grundzügen dargestellt werden. Der immunologische Prozess der experimentell-induzierten Myokarditis wird allgemein in drei Phasen eingeteilt [39]:

1. Akute Phase (0.-3. Tag p.i.)
2. Subakute Phase (4.-14. Tag p.i.)
3. Chronische Phase (ab 14. Tag p.i.)

1.3.1 Akute Phase

Die akute Phase der viralen Myokarditis zeichnet sich, nach Eintritt des Erregers, durch eine fulminante Virämie aus, in Folge dessen es zum Untergang von Kardiomyozyten ohne einhergehendes Immunzellinfiltrat kommt [40, 41]. Ab dem dritten Tag p.i. steigt die Aktivität von natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) und Makrophagen im Myokard [42]. Gesteigerte mRNA-Spiegel proinflammatorischer Zytokine (IL-1 β , IL-2, TNF- α , IFN- γ und IL-6) konnten nachgewiesen werden [43, 44]. Zwar sind diese in Zusammenhang mit kompromittierter linksventrikulärer Pumpfunktion beschrieben [15], es ist jedoch nicht davon auszugehen, dass ein Gewebeschaden in dieser frühen Phase durch immunologische Prozesse entsteht. Vielmehr ist der vorherrschende Schädigungsmechanismus direkt durch das Virus und seinen Replikationszyklus bedingt [45, 46, 42]. Als ein pathogener Faktor in diesem Zusammenhang ist die enterovirale Protease 2A beschrieben, die das Membranprotein Dystrophin spaltet und somit die Zellarchitektur der Kardiomyozyten substantiell beeinträchtigt. Dies wird neben einem Akutschaden auch für die Entwicklung einer DCM in der chronischen Phase diskutiert [47]. In Henrietta Lacks (HeLa)-Zellen konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass sich der gesamte Metabolismus einer mit CVB3 infizierten Zelle in Richtung Apoptose verschiebt [48]. Auch für die Infektion von Kardiomyozyten mit CVB3 konnten apoptosetypische Expressionsmuster nachgewiesen werden [49]. Diese Daten stützen die Annahme, dass sich die Schädigung des Myokards in der Frühphase der Infektion hauptsächlich durch die Interaktion von Virus und Wirtszelle erklären lässt.

1.3.2 Subakute Phase

Während der subakuten Phase findet der Übergang von beginnender zellulärer Abwehr des angeborenen Immunsystems zu einer zielgerichteten Reaktion gegen das Virus statt. Als Antwort auf die gesteigerte Expression diverser Zytokine durch kardiale Zellen formiert sich ein erstes zelluläres Infiltrat, welches aus NK-Zellen, CD4⁺-T-Helferzellen (T_H) und CD8⁺-

zytotoxischen T-Zellen (T_C) besteht [39]. Zu Beginn finden sich maßgeblich NK-Zellen, welche die virale Replikation in der frühen Phase in Schach halten. Das Verhältnis verschiebt sich in Folge jedoch vor allem in Richtung der $CD8^+$ -Zellen, die sich spezifisch gegen die infizierten Zellen richten können [39].

Monozyten/Makrophagen Die Monozyten und Makrophagen gelten als erste Linie der menschlichen Abwehr und gehören dem Mononukleären Phagozyten Systems (MPS) an. Das MPS fasst Zellen zusammen, welche aufgrund ihrer Morphologie, Funktion, Herkunft und Kinetik eine Einheit bilden [50]. Vorläufer-Zellen werden im Knochenmark gebildet und differenzieren hier zu Promonozyten aus. Werden sie ins Blut abgegeben, zirkulieren sie hier als Monozyten. Im Gewebe differenzieren sie unter Einfluss von Zytokinen zu Makrophagen, welche als Hauptaufgabe die Phagozytose von Fremdstrukturen (beispielsweise bakterieller oder viraler Antigene) haben. Sie nehmen aber auch destruierte Körperzellen auf, welche im Lauf des Zellzyklus in Apoptose gegangen sind, oder durch inflammatorische Prozesse zerstört wurden [51]. Alles was sie phagozytieren, präsentieren sie über Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC)-Klasse-II auf ihrer Zelloberfläche und stellen so den vorhandenen Antigenpool für Zellen des adaptiven Immunsystems zur Verfügung (Antigenpräsentation). Wenn Makrophagen durch potentiell gefährliche Antigene, den s.g. Pathogenassoziierten molekularen Pattern (PAMPs) über Toll-like Rezeptoren (TLR) aktiviert werden, steigern sie die Anzahl der MHC-Klasse-II Moleküle auf ihrer Zelloberfläche, um so die Interaktion mit den Zellen des adaptiven Immunsystems zu steigern. Weiterhin induzieren sie durch Freisetzung proinflammatorischer Zytokine und Chemokine die verstärkte Rekrutierung weiterer Immunzellen und begünstigen das Migrieren dieser in das betroffene Gewebe durch Hochregulation von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen [52].

Für die Entstehung inflammatorischer Erkrankungen des Herzens bilden die Monozyten und Makrophagen eine wichtige Schnittstelle [53, 54]. Sowohl ihre Rolle als Verbindungsstelle zwischen angeborener und adaptiver Immunantwort, als ihr übermäßiges Einwandern ins Myokard im Rahmen autoimmunologischer Prozesse wird hier als ursächlich diskutiert [54]. Darüberhinaus werden Monozyten als diagnostischer Marker für die Aktivität des Immunsystems im Rahmen diverser kardiovaskulärer Erkrankungen eingesetzt [55]. Für die Myokarditis werden sie als mögliches Ziel für immunmodulatorische Therapiekonzepte bereits intensiv diskutiert [54].

NK-Zellen Bei den NK-Zellen handelt es sich ebenfalls um Zellen des angeborenen Immunsystems, welche durch IL-2 aktiviert werden und die Fähigkeit haben, ähnlich wie $CD8^+$ -Zellen, viral infizierte Zellen durch Freisetzung zytotoxischer Effektormoleküle in Apoptose zu überführen [56]. Sie müssen hierzu jedoch nicht aktiviert werden, sondern, werden von gesunden Zellen durch die Präsentation regelrechter MHC-1 Moleküle, von der Zytolyse abgehalten werden. Allgemein kann die Wichtigkeit einer NK-Zell-Antwort bei viralen

Infektionen durch valide Daten gestützt werden [57]. Für die Myokarditis hatte eine beeinträchtigte NK-Zell-Antwort in der Maus ein Persistieren der Infektion mit deutlich erhöhten Virustitern zur Folge [58]. Die Effekte von Zytokinen sind jedoch nicht nur auf eine Zellpopularität beschränkt. Ein Botenstoff, kann durchaus mehrere Zelltypen aktivieren bzw. hemmen oder andere Zytokine in ihrer Aktivität beeinflussen. Durch IL-2 werden somit weitere NK-ähnliche Lymphozyten angelockt, die das zytolytische Protein Perforin freisetzen und somit einen erheblichen Schaden am Myokard verursachen [59, 39].

Zytokine Ein wichtiger Bestandteil für die Interaktion der verschiedenen Zelltypen zur Bekämpfung viraler Infektionen sind die Zytokine. Eine zentrale Unterscheidung für die Einordnung der Zytokine in der Pathophysiologie der Myokarditis brachte die Untersuchung von Seko und Kollegen, die zwei zentrale Zytokin-Cluster ausmachen konnten [60]. In der Frühphase der Infektion werden Zytokine maßgeblich von Kardiomyozyten, kardialen Fibroblasten und Endothelzellen als Reaktion auf die Infektion mit dem Virus produziert. Hierzu gehören IL-1 α , IL-5, IL-6 und IL-7. Die zweite Gruppe wird ab dem 5. Tag p.i. von den migrierenden Zellen, maßgeblich NK-Zellen und T-Zellen, produziert. Diese Gruppe besteht aus IL-2, IL-10, TNF- β , IFN- γ und IL-4 [60]. Verschiedene Zytokine sind für die Ausprägung einer Myokarditis und deren Verlauf diskutiert worden [61]. Ein zentrales Element in der frühen antiviralen Reaktion sind die Interferone. Diese gliedern sich im menschlichen Organismus in drei Klassen, welche mit den Buchstaben α , β und γ bezeichnet werden. Bei den Interferonen der α -Familie handelt es sich um mehrere eng miteinander verwandte Proteine, wohingegen das IFN- β auf ein einziges Gen zurückzuführen ist. Sowohl IFN- α als auch IFN- β werden von viral infizierten Zellen als Reaktion auf das Vorkommen doppelsträngiger RNA produziert, welche vom intrazellulären TLR3 als PAMP erkannt wird. Beide IFNe wirken auf unterschiedliche Arten auf die sie umgebenden Zellen [62]. Allgemein schützen Interferone nichtinfizierte Zellen gegen die Replikation von Viren indem sie die Translation insgesamt eindämmen und Gene aktivieren, die zum Abbau von mRNA führen. Sie steigern die Expression von MHC-Klasse-I Molekülen und damit die Präsentation von Antigenen. Gesunde Zellen werden hierdurch vor NK-Zellen geschützt, infizierte Zellen können durch CD8⁺-Zellen erkannt und eliminiert werden [63]. IFN- α und IFN- β binden an den gleichen Rezeptor und haben ähnliche Wirkungen im Rahmen der viralen Abwehr. IFN- γ unterscheidet sich hingegen deutlich von den zuvor genannten und wird vornehmlich von T_H und CD8⁺-Zellen exprimiert. Es ist Teil der adaptiven Immunreaktion und spielt eine wichtige Rolle bei der induzierten Reaktion auf intrazelluläre Pathogene [65]. Die protektive Wirkung von Interferonen, insbesondere IFN- β ist für virale Myokarditiden *in vivo* belegt [66, 67]. Auch Versuche in Zellkultur konnten zeigen, dass die Zugabe von Interferon zu einer signifikanten Reduktion viraler Replikation bei CVB3-Infektion führt [66]. Jüngere Daten aus klinischen Studien zeigen die therapeutische Anwendung beim Menschen [68, 23]. IFN- γ wird vor allem ein

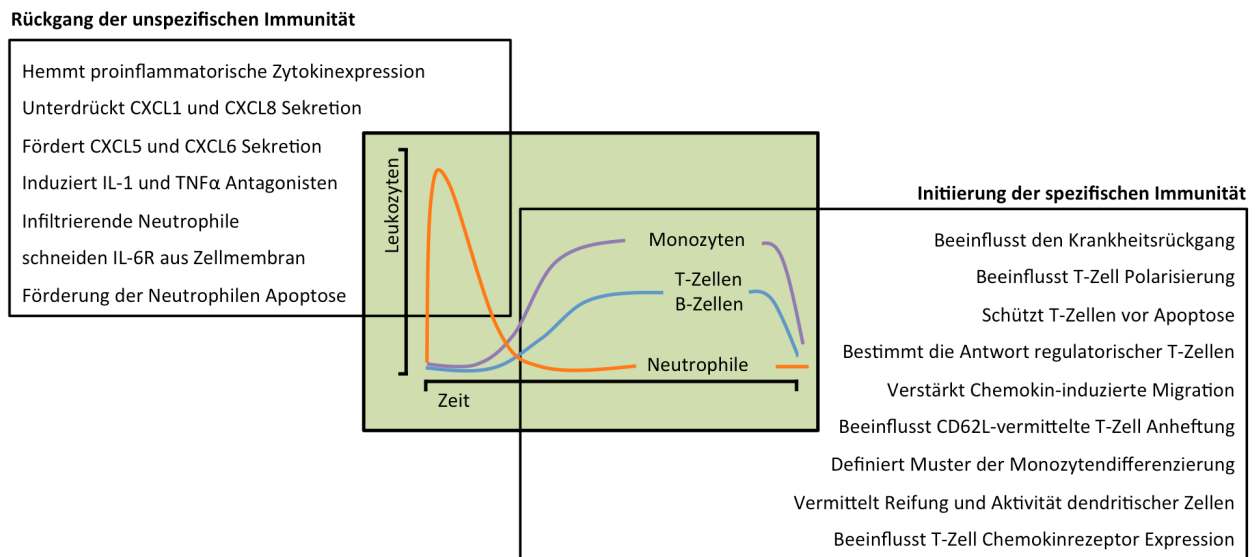


Abbildung 1 – **Einfluss von IL-6 auf die angeborene und erworbene Immunität** IL-6 bestimmt den Übergang von angeborener zu erworbener Immunität durch Einfluss, den es auf beide Arme der Entzündungsreaktion ausübt. Sowohl der Rückgang der neutrophilen Population, als auch die Rekrutierung der mononukleären Zellen, werden durch IL-6 gesteuert. In Anlehnung an [64]

protektiver Effekt in Hinblick auf die Entwicklung einer chronischen Viruspersistenz zugeschrieben [69].

Für IL-1 β und TNF- α konnte gezeigt werden, dass sie ebenfalls in der Frühphase der Infektion ausgeschüttet werden und ihre Expressionsraten mit dem myokardialen Schaden korrelieren [70, 71]. Ein Experiment, welches die Blockade der entsprechenden Zytokine untersuchte, bestätigte dieses Ergebnis [72]. TNF- α hat jedoch im Verlauf der Erkrankung eine Schlüsselposition zur Regulierung der MHC-II-Moleküle auf antigenpräsentierenden Zellen (APC), welche für die spätere Phase der Immunreaktion essentiell ist [70, 71]. Die Rolle von IL-6 bei der viralen Myokarditis zeigt kein einheitliches Bild. IL-6 wirkt auf die verschiedenen Phasen der inflammatorischen Reaktion in verschiedenen Ausprägungen. So konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression in der frühen inflammatorischen Phase einen protektiven Effekt auf das Outcome von Mäusen mit Encephalomyokarditis-Virus induzierter Myokarditis hat. Sie zeigten sowohl eine verbesserte unspezifische Abwehr, als auch ein verbesserte Viruselimination. Eine Überexpression von IL-6 führte jedoch zu verstärkter myokardialer Läsion im Langzeitverlauf durch Beeinträchtigung des gesamten Zytokinnetzwerks und einer vermehrten Viruspersistenz [73]. Für die Eindämmung der Immunreaktion nach erfolgter Bekämpfung der Infektion wird von den T_H2-Zellen IL-10 exprimiert, welches die T_H1-vermittelte Immunreaktion hemmt und das Überleben und die Antikörperproduktion der B-Zellen fördert.

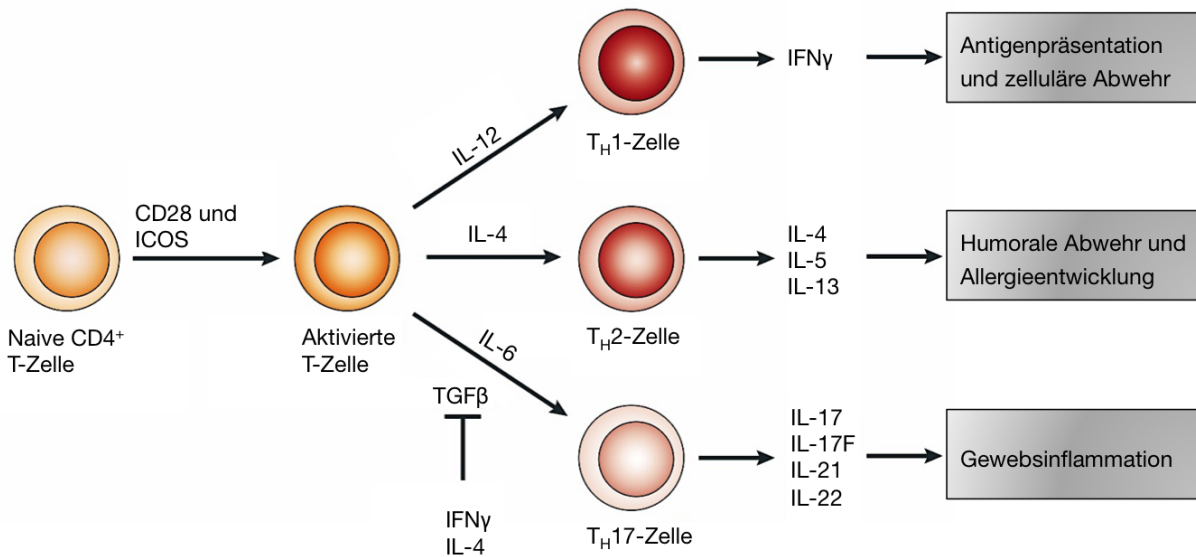


Abbildung 2 – **Differenzierung der T_H -Zell-Population** Durch Stimulation über CD28 in Kombination mit dem induzierbaren T-Zell Co-Stimulator (ICOS) wird die naive T-Zelle aktiviert und differenziert unter Einfluss der jeweiligen Zytokine in eine der drei angegebenen T_H -Zellpopulationen aus. Abbildung aus [74]

T-Zell vermittelte Reaktion T-Lymphozyten oder Thymozyten sind als Teil des adaptiven Immunsystems für die Steuerung und zielgerichtete Bekämpfung des viralen Infekts verantwortlich. Die wichtigsten Vertreter dieser Zellpopulation sind die $CD4^+$ -T-Helferzellen (T_H), $CD8^+$ -zytotoxische T-Zellen ($CD8^+$ -Zellen), regulatorische T-Zellen (T_{REG}) und die T-Gedächtniszellen (T_M). Die T_M -Population kann sowohl aus $CD4^+$ als auch $CD8^+$ Zellen entstehen. $CD8^+$ -Zellen differenzieren nach Aktivierung alle zu zytotoxischen Effektorzellen, die nach Erkennen pathogener Antigene, welche über MHC-Klasse-I von infizierten Zellen präsentiert werden, solche abtöten. Die $CD4^+T_H$ wiederum gliedern sich in diverse Unterpopulationen, welche unter Anderem bei der Initiierung der humoralen Immunität eine wichtige Rolle spielen. Sogenannte T_{H0} -Zellen oder auch naive T_H -Zellen finden sich im Blut und im Lymphsystem des Organismus. Werden sie nun von einer APC über MHC-Klasse-II stimuliert, differenzieren sie entweder in Richtung der T_{H1} -, T_{H2} -, T_{H17} oder T_{REG} -Linie aus [75]. IL-6 fungiert hierbei als ein wichtiger Co-Stimulator zur Proliferation der T-Zellen [76]. Naive T_H haben ein bestimmtes Zytokinprofil, welches sie im naiven Zustand in moderaten Leveln sekretieren. Im differenzierten Zustand exprimieren sie dann ein spezifischeres Profil mit signifikant höheren Expressionsraten (Abbildung 2) [74]. In welche Richtung sich die aktivierte T_H -Zelle entwickelt wird von diversen Faktoren zu Beginn der Immunantwort bestimmt. Wesentlichen Einfluss hierauf hat das initial exprimierte Zytokinprofil, welches auf die Zelle einwirkt [77]. So fördert IL-6 synergistisch mit Transforming Growth Factor β (TGF- β) die Ausreifung aktivierter T_{H0} -Zellen in Richtung der T_{H17} -Zelllinie in starkem

Maße [78, 79]. Darüber hinaus ist IL-6 wichtig für die Ausbildung einer antigenspezifischer T_H17 -Zellen [80].

Die einzelnen Zelllinien der T_H -Population sind für die Pathogenese der Immunreaktion im Rahmen der viralen Myokarditis von immenser Bedeutung. So konnte gezeigt werden, dass T-Zell-defiziente Mäuse die Myokarditis nicht vollständig ausprägen [14, 81, 82, 83]. Für die T_H1 vermittelte Immunreaktion konnte im Modell der viralen Myokarditis bereits gezeigt werden, dass sie durch Reduktion der Virusreplikation [84] und relativer Eindämmung der T_H2 Antwort sowohl die Viruslast initial senkt, als auch präventiv in Hinblick auf die Entwicklung einer DCM wirkt [12]. Für die T_H2 vermittelte Immunreaktion ist belegt, dass sie zwar die Inflammation im Rahmen einer akuten Myokarditis senken kann [85, 86], in diesem Zuge aber die Entwicklung einer DCM durch Stimulation des kardialen Remodelings begünstigt [87, 88]. Die T_H17 -Antwort wird, gemeinsam mit erhöhten IL-17-Spiegeln, mit einer häufigeren Entstehung einer DCM durch gesteigertes Remodeling, sowohl im reinen CVB3-Modell als auch im Rahmen der Experimentelle Autoimmunmyokarditis (EAM), in Verbindung gebracht [89, 90].

B-Zell vermittelte Reaktion B-Zellen tragen ihren Namen aufgrund ihres Bildungsortes, dem Knochenmark (englisch *bone marrow*), und stellen gemeinsam mit den T-Zellen den zellulären Teil der adaptiven Immunität dar. Sie sind in der Lage nach Aktivierung spezifische Antikörper gegen pathogene Strukturen zu bilden. Die Aktivierung der B-Zellen erfolgt in den meisten Fällen durch T_H -Zellen. Die B-Zelle, welche mit einem Pathogen in Kontakt gekommen ist und dieses über den B-Zell-Rezeptor aufgenommen hat, zerlegt es im Zellinneren und präsentiert es über MHC-Klasse-II den T-Zellen. Diese können dann mit dem T-Zell Rezeptor (TCR) hieran binden und die B-Zelle nun befähigen, sich klonal zu vermehren und zielgerichtete Antikörper gegen dieses Antigen zu bilden [56]. Die vollständige Elimination des Virus im Krankheitsverlauf der viralen Myokarditis geschieht durch neutralisierende Antikörper, die von B-Zellen gegen das Virus gebildet werden [91]. Die Titer von Virus und neutralisierenden Antikörpern bewegen sich entgegengesetzt. Ab Tag 4 p.i. konnte ein Anstieg der Antikörper beobachtet werden, der zwischen Tag 8 und Tag 10 sein Maximum erreicht. Das Virus ist bei unbeeinträchtigtter Immunreaktion nach 10 Tage nicht mehr nachweisbar [91].

1.3.3 Chronische Phase

Für die chronische Phase der Myokarditis ist ein konkretes Zeitfenster nicht anzugeben. Es ist davon auszugehen, dass bei regelrechter Immunantwort das Virus im Myokard innerhalb von 14 Tagen eliminiert ist [91]. Nichtsdestotrotz ist eine Komplikation nach akut verlaufener viraler Myokarditis die Entwicklung einer DCM, die nicht selten zu fulminanter Herzinsuffizienz und, im schlimmsten Fall, zur Transplantation führt. Wie beim Menschen, so ist eine DCM auch in der Maus induzierbar. Viele Faktoren sind für den Übergang von

akuter Infektion zu chronischer Inflammation diskutiert worden. Als die zwei wichtigsten Mechanismen gelten eine Persistenz viraler RNA im Myokard [92] sowie die Entwicklung einer autoimmunologischen Komponente [70] nach erfolgreicher Viruselimination [34]. Gerade der Erkennung und Bekämpfung viraler Infektionen durch das angeborene Immunsystem kommt für die Entwicklung von Autoimmunprozessen eine Schlüsselrolle zu [93]. Doch virale Prozesse allein sind nicht zwangsläufig mit dem Übergang in eine chronische Myokarditis verknüpft. Die Bedeutung der T-Zellen, wie sie weiter oben schon erwähnt wurde, scheint in diesem Zusammenhang ebenfalls von großer Bedeutung zu sein, was Woodruff und Woodruff schon sehr früh zeigen konnten [14]. Die Aktivität der Zytokine ist für das Entstehen von Autoimmunität ebenfalls relevant [94]. B10.A (H-2a) Mäuse entwickeln nach CVB3 induzierter Myokarditis unter Normalbedingungen keine chronisch autoimmunologische Form. Nach Immunmodulation mit IL-1 und TNF- α war dies jedoch induzierbar [71]. Doch auch IL-6 scheint gerade bei diesem Schritt zur chronischen Myokarditis eine wichtige Position einzunehmen. So konnte gezeigt werden, dass eine IL-6-Defizienz im murinen Versuch die Entwicklung einer Autoimmunmyokarditis verhindert, begleitet von einer gestörten Regulation des Complementsystems [95]. In diesem Zusammenhang belegten Yamashita und Kollegen die Bedeutung von IL-6 im Rahmen der T_H17-Zell Differenzierung im Modell der EAM und ordneten diesem Prozess eine Schlüsselrolle für die Initiation der EAM zu [96].

1.4 Myokardiales Remodeling

Neben den viral bedingten Schäden und inflammatorischen Prozessen, die das Myokard nachhaltig schädigen können, ist in den letzten 15 Jahren immer mehr Arbeit in die Erforschung extrazellulärer Matrixbestandteile investiert worden. Gemeinsam mit der Synchronität myokardialer Kontraktion ist die extrazelluläre Matrix (ECM) für die Erregungsausbreitung und Rückbildung essentiell [97]. Neben immunologischen Prozessen kardialer Zellen rückt die Regulation der Matrix immer mehr in den Fokus der Forschung [98]. Kommt es im Zuge einer chronischen Myokarditis zu autoimmunologischen Prozessen im Myokard, werden auch Reparaturvorgänge im Interstitium dauerhaft aktiviert. Die Folge können überschießende Fibrose und fortschreitende Dilatation des linken Ventrikels sein [99].

Extrazelluläre Matrix Die Architektur der kardialen Matrix ist ein feinreguliertes System von Aufbau und Abbau verschiedenster Strukturmodule wie Glykoproteinen, Proteoglykanen, Glucosaminoglykanen und verschiedenen Kollagenen [100]. Das im Herzen maßgeblich vorkommende Kollagen ist vom Typ I oder Typ III. Zwar finden sich in geringen Mengen auch Kollagen IV und V, jedoch nicht in bedeutenden Mengen [101]. Die Kollagene werden von kardialen Fibroblasten produziert und bestehen aus drei α -Polypeptidketten, die in linksgängigen Kollagenhelices vorliegen. Das Kollagen I ist im wesentlichen strukturgebend, wohingegen das Kollagen III die Elastizität des Myokards bestimmt [101]. Die Anteile der

Kollagene zueinander ist für die Form und Funktion des Herzens entscheidend, sie ändert sich im Verlauf des Alterns und ist hierbei im wesentlichen für die natürlichen Funktionseinbußen bestimmend [102, 103]. Im Krankheitsverlauf einer DCM konnte gezeigt werden, dass sich ebenfalls das Verhältnis des kardialen Kollagens hin zu Kollagen I verschiebt, was mit einer Versteifung des Ventrikelmyokards einhergeht [104].

Funktion der Matrixmetalloproteinasen (MMP) Wesentlich verantwortlich für die Steuerung der kardialen Reparaturvorgänge sind die Matrix Metalloprotease (MMP). Diese Gruppe von Endoproteinasen teilt die Eigenschaft, die Spaltung von Peptidbindungen in Proteinen zu katalysieren. Die Peptidasedomäne, bindet fast bei allen MMPs an das Metallion Zink, was ihnen den Namen verlieh [99]. Sie werden aufgrund ihrer Substratspezifität bzw., wie im Fall der vierten Gruppe, aufgrund der Lokalisation, in vier Gruppen unterteilt, was in Tabelle 3 dargestellt ist.

Tabelle 3 – **Unterteilung der Matrixmetalloproteinasen** Die MMPs werden aufgrund ihrer Substratspezifität bzw. Lokalisation in vier Gruppen unterteilt. Nach [99]

Gruppe	Bezeichnung	MMPs (Name)
1	Kollagenasen	MMP-1 (interstitielle Kollagenase) MMP-8 (neutrophile Kollagenase) MMP-13 (Kollagenase-3)
2	Gelatinasen	MMP-2 (Gelatinase-A, 72 kDa) MMP-9 (Gelatinase-B, 92 kDa)
3	Stromelysine	MMP-3 (Stromelysin 1) MMP-10 (Stromelysin 2) MMP-11 (Stromelysin 3)
4	Membranassoziierte MMPs	MMP-14 (MT1-MMP) MMP-15 (MT2-MMP) MMP-16 (MT3-MMP) MMP-17 (MT4-MMP)

Die Einteilung der MMPs nach den Substraten kann jedoch keineswegs als absolut angesehen werden. So ist bekannt, dass die Gelatinasen MMP-2 und MMP-9 ebenfalls in der Lage sind, Kollagene zu spalten [105, 106] und ihnen in der Entwicklung kardiovaskulärer Erkrankungen eine wichtige Rolle zukommt [107]. Sowohl im Rahmen des Postinfarktgeschehens [108, 109] als auch bei der Entwicklung einer hypertrophen Kardiomyopathie durch chronische Volumenbelastung [110] ist der Einfluss der Gelatinasen belegt. Aber auch für die virale Myokarditis sind aus unserer Arbeitsgruppe bereits Daten zur Bedeutung der MMP-2 vorgelegt worden [111, 112]. Die Aktivität der MMPs ist durch ein exakt regu-

liertes Zusammenspiel aus Aktivierung und Hemmung so genannter Gewebsinhibitoren der MMPs (TIMPs) reguliert. Die Steuerung der Expression von MMPs wird maßgeblich durch die Aktivität von Zytokinen gesteuert. IL-6 hat laut jüngerer Daten einen wichtigen Einfluss auf die Freisetzung von MMP-9 [113].

1.5 Interleukin-6 (IL-6)

IL-6, ein Zytokin aus der Familie der vier-helikalen Zytokine [114], spielt eine zentrale Rolle im Ablauf der inflammatorischen Reaktion des Körpers auf bakterielle oder virale Strukturen. Darüber hinaus wird seine Bedeutung für die Aufrechterhaltung, eventuell sogar die Entstehung, entzündlicher Erkrankungen diskutiert [115, 116, 117]. IL-6 ist als pro- und antiinflammatorischer Botenstoff beschrieben [118]. Es löst die Akut-Phase-Reaktion in der Leber aus und stimuliert Lymphozyten zu Wachstum und Differenzierung [119]. Prinzipiell kann IL-6 an jeder Zelle seine Wirkung entfalten. Aufgrund seiner bedeutenden Funktion während der Entzündungsreaktion (Abbildung 1) wird IL-6 als verlässlicher Marker für die Aktivierung des Immunsystems bei schweren Krankheitsverläufen diagnostisch verwendet [120, 121].

1.5.1 Die Entdeckungsgeschichte von IL-6

Die Entdeckung von IL-6 wird heute Tadamitsu Kishimoto zugeschrieben, einem japanischen Forscher, der über 35 Jahre zu dem Molekül gearbeitet hat. Während der 1970er und 1980er Jahre wurde intensiv an Zell-Zell-Interaktionen geforscht und die Bedeutung von Zytokinen für immunologische Prozesse wurde immer klarer. In der Gruppe von Kishimoto wurde IL-6 zunächst als B-Zell stimulierender Faktor 2 (BSF-2) benannt [122], da es von T-Helferzellen ausgeschüttet wird und essentiell für die Induktion von Proliferation und Differenzierung der B-Zellen ist. Ausgehend von der Entdeckung, dass für die Entwicklung von naiven B-Zellen hin zu antikörperproduzierenden Zellen nicht zwangsläufig T-Zellen benötigt werden, sondern dies durch einen von T-Zellen produzierten Stoff zu initiieren ist [123], wurden diverse dieser Faktoren benannt. So wurde das Molekül, welches heute unter dem Namen IL-4 bekannt ist, aufgrund seiner zentralen Funktion für die Aktivierung ruhender B-Zellen, als B-Zell stimulierender Faktor 1 (BSF-1) benannt [124, 125]. Für Wachstum bereits aktivierter B-Zellen wurde der B-Zell Wachstumsfaktor 2 (BCGF-2) benannt, ein Stoff, der heute als IL-5 bekannt ist [126]. Für die finale Differenzierung der aktivierten B-Zellen zu antikörperproduzierenden Zellen schließlich, ist IL-6 oder BSF-2 erforderlich [127]. Zeitgleich wurde *in vitro* festgestellt, dass ein Molekül eine antivirale Aktivität aufwies, welche durch ein Anti-Interferon neutralisiert werden konnte, daher erhielt es den Namen Interferon (IFN)- β 2 [128]. Weitere Experimente zeigten jedoch, dass dieser als IFN- β 2 benannte Stoff keine antivirale Aktivität besitzt [129] und die Klonierung brachte schließlich den Beweis, dass es sich bei dem untersuchten Molekül einmal mehr um das schon in mehreren Zusammenhängen

gefundene Zytokin IL-6 handelt [130]. Noch später wurde durch die Sequenzierung bekannt, dass auch ein weiterer Stoff, nämlich der Hepatozyten-stimulierende Faktor, molekular mit dem Stoff IL-6 übereinstimmt [131, 132]. Auch für die Entwicklung myeloischer Zellen hat IL-6 eine aktivierende Wirkung. So stellte sich nach Klonierung auch heraus, dass es sich bei dem Makrophagen und Granulozyten Induktor Typ 2 (MGI-2) ebenfalls um das beschriebene Zytokin handelt [133]. Unter diesem Gesichtspunkt verwundert es nicht, dass der selbe Stoff auch bei malignen Erkrankungen dieser Zellen, wie dem multiplen Myelom oder dem Plasmozytom, eine wesentliche Rolle für das Wachstum einnimmt. Daher wurde der Stoff zusätzlich auch als Plasmozytom- bzw. Myelom-Wachstumsfaktor benannt [134, 135].

1.5.2 Das IL-6 Rezeptorsystem

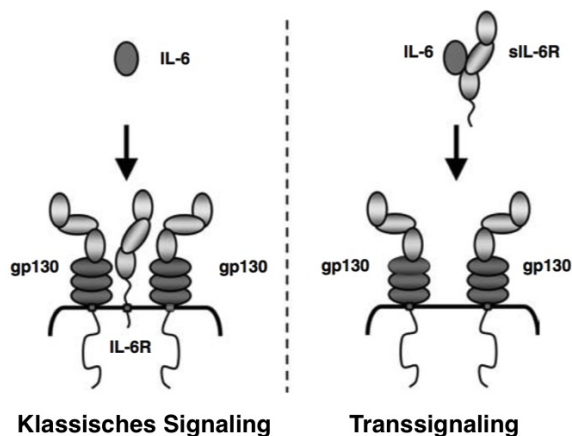


Abbildung 3 – **IL-6 Rezeptorsysteme** Dargestellt ist der Weg des klassischen Signalings unter Beteiligung des membranständigen IL-6-Rezeptors (IL6-R) und der Weg des Transsignalings mittels des gelösten Rezeptors (sIL6-R). In Anlehnung an [136]

IL-6 kann auf zweierlei Weise als Ligand an seinen Rezeptor binden (Abbildung 3). Der klassische Weg setzt den membranständigen IL-6 Rezeptor (IL6-R) voraus, der aus zwei Polypeptidketten besteht und maßgeblich auf Hepatozyten und verschiedenen Lymphozyten expremiert wird. Die erste Domäne bildet mit einer atomaren Masse von 80 kDa die IL-6 spezifische Einheit und stellt das Element dar, welches den Rezeptor als IL6-R definiert [137]. Die zweite Einheit ist das ubiquitär expremierte Glykoprotein 130 (gp130), welches aufgrund des atomaren Gewichts von 130 kDa seinen Namen erhielt. Insgesamt finden sich zwischen IL-6 und IL6-R drei Bindungsstellen, die den drei Seiten des IL-6 Moleküls entsprechen (siehe Abbildung 3). Die erste Seite ist die direkte

Bindungsstelle zum IL-6 spezifischen Element des Rezeptors. Die zweite Seite ist geteilt in D2 und D3 und stellt die Verbindung zwischen IL-6 und dem ersten gp130-Molekül dar, welche auch als zytokinbindende Domäne bezeichnet wird. Die dritte Seite schließlich ist die IgG-ähnliche Domäne, welche als D1 bezeichnet wird und die Bindung zum zweiten gp130-Molekül darstellt [138, 139]. Als ein Rezeptorkomplex werden zwei IL-6 Moleküle bezeichnet, die an zwei IL6-R und zwei gp130-Moleküle binden [140]. Durch diese Bindung zu einem Hexamer, werden die gp130-Moleküle, die die transmembranöse Domäne darstellen, dimerisiert und lösen eine spezifische Signalkaskade im Zellinneren aus, welche die Transkription verschiedener Zielgene im Zellkern reguliert [118]. Dabei binden die zwei gp130-Einheiten mit einer IL6-R-Einheit und führen zu einer Phosphorylierung von monomeren STAT-Faktoren,

die daraufhin Homo- und Heterodimere bilden. Sie wandern in den Zellkern und regulieren dort die Transkription der entsprechenden Gene. Dieser Weg wird als klassischer Signalweg oder IL6-Signaling bezeichnet [141]. Abgesehen vom IL6-Signaling ist der alternative Weg, das IL6-Trans-Signaling, über einen löslichen IL-6 Rezeptor (sIL6-R) möglich. Über den alternativen Weg kann IL-6 auch an Zellen ohne membranständigen Rezeptor wirksam werden [136], die sonst für das Zytokin nicht empfänglich wären. Hierzu wird der membranständige Rezeptor durch Proteolyse mittels der A Disintegrin And Metalloproteinase (ADAM) von der Zelle abgespalten (Shedding) und liegt dann in gelöster Form vor. Eine zweite Möglichkeit besteht durch alternatives Splicing. IL6 kann nun an sIL6-R binden und als IL6/sIL6R-Einheit mit gp130 auf Zellen ohne membranständigen IL6R eine Signalkaskade auslösen [136]. Das Molekül gp130 ist neben seiner Funktion im IL6-R und dem Transsignaling für IL-6 noch Bestandteil von Rezeptoreinheiten für diverse weitere Zytokine. So dient es beispielsweise als Subeinheit der Rezeptoren für IL-11, Leukämie hemmender Faktor (LIF), Ziliärer neurotroper Faktor (CNTF), Cardiotrophin-1 (CT-1), Oncostatin M (OSM), Cardiotrophin-like Cytokine Factor 1 (CLCF1), Neuropoetin (NP) und IL-27.

1.5.3 Die IL-6 Signalkaskade und ihre Regulation

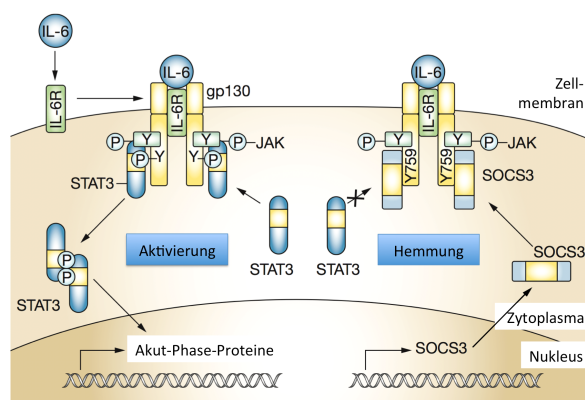


Abbildung 4 – **IL-6 Feedbackmechanismus** Negativer Feedbackmechanismus des IL-6 Signaling durch Zytokinsuppressoren (SOCS-1), die aus dem STAT3 Signalweg entstehen und inhibitorisch auf die Jak-Tyrosinkinase wirken. In Anlehnung an [119]

te Zielgene regulieren [142]. Die Tatsache, dass eine Überproduktion von IL-6 mit diversen Autoimmunerkrankungen assoziiert ist [143], ein vollständiger Mangel jedoch zur Beeinträchtigung essentieller immunologischer Prozesse führt [144], lässt vermuten, dass die Expression des Zytokins sehr fein geregelt ist. Die Produktion von IL-6 kann durch diverse Zellen

Bindet IL-6 an seinen Rezeptor IL6-R oder führt ein IL-6/sIL6-R Komplex zur Dimerisierung zweier gp130-Moleküle auf Zellen, die den IL6-R nicht exprimieren, folgt eine Signaltransduktion via dem Jak/Signal Transduktoren und Aktivatoren für Transkription (STAT)-Signalweg [142]. Hierbei führt die Bindung des Liganden an den Rezeptor zur Aktivierung von Jak-Tyrosinkinasen (Jak1, Jak2, Tyk2) und damit zur Phosphorylierung der zytoplasmatischen Seite von gp130. Hier befinden sich zahlreiche STAT-Faktoren (maßgeblich STAT1 und STAT3), die mit passenden Src-homology 2 (SH2)-Domänen an gp130 gebunden sind. Diese werden ebenfalls phosphoryliert, bilden Dimere und dissoziieren in Richtung Zellkern, wo sie nun bestimmte

(siehe Tabelle 4) initiiert werden, doch nur bestimmte Zellen sind regelhaft empfänglich für den Botenstoff. Hepatozyten und Granulozyten exprimieren hierzu den IL6R auf ihrer Zellmembran. Andere Zellen sind nur in Anwesenheit des sIL6-R in der Lage intrazelluläre Prozesse nach Bindung von IL-6 auszulösen [119]. IL-6 wird durch verschiedenen Feedbackschleifen reguliert. Es besteht eine positive Verstärkung über das Akut-Phase-Protein C-reaktives Protein (CRP), dessen Synthese in den Hepatozyten durch IL-6 gefördert wird. Dieses Protein selbst induziert die Produktion und Freisetzung von IL-6 aus Endothelzellen [145]. Auf diese wirkt IL-6 proinflammatorisch indem es die Expression von Adhäsionsmolekülen und Chemokinen steigert. Zur Negativregulation der IL-6 Expression sind im Wesentlichen zwei Mechanismen zu nennen. Zum Einen werden allgemein STAT-Proteine durch die konstitutiv exprimierten Protein Inhibitoren aktivierter STAT-Proteine (PIAS) gehemmt. PIAS3 wurde als spezifisch für STAT3 gefunden und bei *in vitro*-Versuchen als direkter Inhibitor für IL-6 verwendet. PIAS3 blockiert die DNA-bindende Aktivität von STAT3 und hemmt so die STAT3 vermittelte Genregulation [146]. Zum Anderen wird durch die Suppressoren des Zytokinsignalings (SOCS), welche erst in Folge einer IL-6 induzierten Transduktion frei werden, bestimmt. Diese wiederum binden direkt an die Jak und hemmen ihre katalytische Aktivität, sodass eine erneute Bindung von IL-6 nicht mehr zu einer Produktion von STAT3 führt [147]. Glucokortikoide haben ebenfalls einen negativen Einfluss auf die IL-6 Produktion in diversen Gewebe- und Zellarten [148].

Tabelle 4 – **IL-6 produzierende Zellen** IL-6 wird von diversen Zellen, im Rahmen der immunologischen Reaktion bzw. der Akut-Phase Induktion produziert und freigesetzt. Die folgende Übersicht zeigt, für welche Zelllinien ein solches Verhalten belegt ist. In Anlehnung an [149].

Humane Zellen	Zelllinien	Maligne Zellen
T-Zellen	T-Zellen (HTLV-1)	Myxomzellen
B-Zellen	Monozyten (U937)	Myelomzellen
Monozyten	Monozyten (P388D1)	Hypernephromzellen
Fibroblasten	Osteosarkom (MG63)	
Keratinocyten	Blasenkarzinom (T24)	
Endothelzellen	Lungenkarzinom (A549)	
Astrozyten	Glioblastom (SK-MG-4)	
Knochenmarkzellen	Astrozytom (U373)	
Mesangiomzellen		

1.5.4 Die biologischen Funktionen von IL-6

Immunsystem IL-6 spielt eine zentrale Rolle beim Übergang von der unspezifischen Immunität zur spezifischen antikörpervermittelten Immunreaktion. Wie schon zuvor beschrieben, induziert IL-6 in diesem Zusammenhang den finalen Schritt von der aktivierten B-Zelle hin zur antikörperproduzierenden Zelle. Dies konnte in Experimenten mit Pokeweedmitogenstimulierten Zellen belegt werden. Diese produzierten bei Applikation von IL-6 wesentlich mehr Antikörper der Gruppe IgM, IgG und IgA. Diese IL-6 induzierte Antikörperproduktion konnte durch einen IL-6 Antikörper fast vollständig aufgehoben werden, die B-Zell Proliferation hingegen blieb von diesem Antagonismus unberührt, was darauf hinweist, dass die Proliferation der aktiven B-Zellen von IL-6 unabhängig ist [144]. Aber auch viele weitere Funktionen machen das Zytokin unerlässlich für eine funktionierende immunologische Reaktion, insbesondere den für „immunologischen Switch“ betreffend (siehe Abbildung 1) [64]. So werden beispielsweise T-Zellen, die im Gegensatz zu B-Zellen auch als ruhende Zellen den IL-6 Rezeptor exprimieren, zu Wachstum und Proliferation angeregt [150]. Auch die Differenzierung von T-Zellen wird maßgeblich durch IL-6 beeinflusst [74]. Auf die genauen immunologischen Mechanismen, die IL-6 im Zuge der Myokarditis beeinflusst, soll weiter unten detaillierter eingegangen werden.

Akut-Phase-Reaktion in der Leber Als Akut-Phase-Reaktion wird eine systemische Reaktion des Organismus auf einen Entzündungsreiz bezeichnet, die gekennzeichnet ist durch eine nachweisbare Leukozytose kombiniert mit Fieber, gesteigerter Gefäßpermeabilität, Beeinträchtigung des Eisen- und Steroidhaushalts und nachweisbare Serumspiegel der Akut-Phase-Proteine, die zum größten Teil in der Leber synthetisiert werden [149]. Die wichtigsten Faktoren, die diese Synthese initiieren sind TNF- α , IL-1 und IL-6 [151]. Bei *in vivo* Experimenten mit Ratten konnte gezeigt werden, dass IL-6 eine ähnlich starke Akut-Phase-Reaktion hervorruft, wie die Injektion mit Terpentin bei einem deutlich schnelleren Anstieg der Proteinlevel im Serum [152]. Auch bei Schwerbrandtverletzten korrelierte der Anstieg von IL-6 mit dem des CRP und dem Fieberanstieg [153]. Bei Schwerstkranken auf Intensivstationen wird IL-6 daher als verlässlicher Entzündungsmarker genutzt und auch in der Pädiatrie kann er sensitiver eine Entzündung detektieren, als das CRP [120].

1.5.5 IL-6 bei kardiovaskulären Erkrankungen

Die genaue Bedeutung von IL-6 bei der Entstehung inflammatorischer Erkrankungen ist noch nicht im Detail geklärt. Es wurde jedoch eine starke Korrelation der IL-6- und sIL6R-Konzentration mit dem Schweregrad anderer entzündlicher Erkrankungen beobachtet [117]. Es kann daher angenommen werden, dass IL-6 eine Auswirkung auf den Verlauf und die Schwere der Inflammation im Bereich des Herzens und der Gefäße hat. Im Folgenden sollen die wichtigsten kardiovaskulären Erkrankungen im Hinblick auf die Bedeutung von IL-6 im

Krankheitsverlauf kurz dargestellt werden. Die Systematik der folgenden Zusammenstellung ist angelehnt an [154].

Autoimmunmyokarditis Bei der Autoimmunmyokarditis richtet sich das Immunsystem des Körpers gegen eigene kardiale Strukturen, wie beispielsweise das Myosin, und löst so eine ähnliche Inflammation, wie nach viraler Myokarditis ohne pathologisches Agens aus. Die Experimentelle Autoimmunmyokarditis (EAM) ist ein verlässliches Nagermodell zur Untersuchung der zugrunde liegenden Pathologie [155]. Gemeinsam mit TGF- β ist IL-6 essentiell für die Differenzierung von naiven T-Zellen zu T_H vom Typ T_H17 [156, 157]. Durch die Transduktion der beiden Faktoren über den STAT3-Signalweg [158] wird Reinoic acid receptor-related orphan nuclear receptor γ t (ROR γ t) induziert, welcher als T_H17-Transkriptionsfaktor fungiert [159] und die Differenzierung der T-Zellen vorantreibt. Die Menge an T_H17-Zellen ist ausschlaggebend für den Verlauf einer Autoimmunmyokarditis und kann diese sogar initiieren [96]. IL-6-defiziente Mäuse waren gegen die Ausprägung einer EAM resistent [95]. Dies spricht dafür, dass IL-6 auch in diesem Zusammenhang eine Schlüsselposition einnimmt.

Koronare Herzkrankheit Bei Patienten, die eine Koronare Herzkrankheit (KHK) hatten korrelieren erhöhte CRP und IL-6 Serumwerte mit gesteigerter Mortalität [154, 160]. Es besteht der Verdacht, dass proinflammatorische Zytokine an der Destabilisierung atherosklerotischer Plaques in den Koronargefäßen und in Folge deren Ruptur beteiligt sind [154, 161]. Als zugrunde liegender Pathomechanismus wird die vermehrte Rekrutierung von MMPs diskutiert, welche durch proinflammatorische Zytokine hochreguliert werden [154, 162]. Unterstützt wird diese Annahme durch Daten, die belegen, dass hospitalisierte Patienten, die kardiale Komplikationen bei instabiler Angina pectoris erleiden, deutlich höhere IL-6 Spiegel aufweisen, als solche, die bei gleicher Diagnose keine Komplikationen haben [154, 163].

Chronische Herzinsuffizienz Ähnlich wie bei der KHK korreliert ein hoher Serumspiegel von IL-6 auch im Rahmen der chronischen Herzinsuffizienz mit eingeschränkter linksventrikulärer Funktion bei dauerhafter Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) [164]. Ebenso wird das Fortschreiten einer Herzinsuffizienz durch den Anstieg der myokardialen IL-6-Expression begleitet [165]. Diese Daten lassen vermuten, dass der Spiegel von IL-6 als prädiktiver Faktor im Rahmen einer Verlaufskontrolle bei Patienten mit Herzinsuffizienz nutzbar gemacht werden könnte. Es besteht jedoch bisher keine Klarheit darüber, ob ein Anstieg zirkulatorischer proinflammatorischer Zytokine, die bei konstanter Druckbelastung des Herzens zu finden sind [166], in kausalem Zusammenhang mit kardialen Funktionseinbußen stehen, oder ob es sich hierbei um ein Epiphenomen der Erkrankung handelt [154, 167].

Hypertrophe Kardiomyopathie Tierexperimentelle Daten haben gezeigt, dass eine Überexpression von IL-6 bzw. IL-6R allein nicht mit kardialer Hypertrophie vergesellschaftet ist [154, 168]. Es besteht aber ein Zusammenhang zwischen dem Signaling via gp130 und der physiologischen Regulation des Myokardwachstums beeinflusst durch CT-1. So konnte gezeigt werden, dass ein vermehrtes Signaling über gp130 mittels des sIL-6R sehr wohl zu einer pathologischen Hypertrophie des Myokards führt [154, 169].

Endokarditis Das größte Problem in der Behandlung der Endokarditis ist die Nachweisbarkeit des zugrundeliegenden Erregers, die nur in 40% der Fälle gelingt [170, 171]. Bei Patienten mit rheumatischer Endokarditis wurde in klinischen Untersuchungen festgestellt, dass die IL-6 Spiegel mit dem Krankheitsverlauf korrelieren, wohingegen die Serumspiegel für IL-1 und TNF- α keine Aussagekraft haben. Es bleibt jedoch unklar, welche Kausalbeziehung zwischen den Zytokinspiegeln und dem Krankheitsverlauf besteht [172]. In einer groß angelegten Studie bei Patienten mit und ohne Erregernachweis in der Blutkultur, konnte gezeigt werden, dass die IL-6 Spiegel jedoch in beiden Gruppen gleich hoch waren. Es kann also geschlossen werden, dass IL-6 als Verlaufsmarker für den Therapieerfolg bei Endokarditis genutzt werden kann und so als Brücke für die diagnostische Lücke, die durch einen negativen Erregernachweis entsteht, fungiert [173].

Myxom Das kardiale Myxom, ein gutartiger Tumor, der dem kardialen Mesenchym entspringt und in 85% der Fälle seine Lokalisation im linken Vorhof hat (atriales Myxom), ist in der Lage selbst IL-6 zu produzieren [154, 174, 175]. Es sind daher Fälle in der Literatur bekannt, die ein vermehrtes Auftreten von mediastinalen Lymphadenopathien und kardialer Hypertrophie, vergesellschaftet mit Myxomen, darstellen [154, 176, 177]. Darüberhinaus, weisen Patienten mit Myxomen, allgemein deutlich mehr Symptome von Autoimmunprozessen auf [178], was vor dem Hintergrund der Bedeutung, die IL-6 auf die immunologische Reaktion hat, nicht verwundert.

1.5.6 Blockade von IL-6 als therapeutische Option

Die Bedeutung von IL-6 für akute entzündliche Geschehen, wie auch für Autoimmunkrankheiten, sind in den vorangegangenen Abschnitten in verkürzter Form dargestellt worden. IL-6 hat eine tragende Rolle bei der Initiierung der frühen inflammatorischen Antwort und kann als Marker für den Verlauf von Inflammation beurteilt werden. Es stellt sich daher die Frage, ob die Blockade des IL-6 Signalings als Mittel zur Eindämmung inflammatorischer Aktivität dienen könnte. Studien zu dieser Frage haben gezeigt, dass eine vollständige IL-6-Defizienz kein zufriedenstellendes Ergebnis liefert, da es hierdurch zu einer Beeinträchtigung des gesamten Immunsystems kommt. Die direkte Neutralisierung von IL-6 mittels Antikörper, führte zur Akkumulation von Immunkomplexen und wurde schließlich wieder verworfen [179]. Die Rezeptorblockade schließlich stellte einen guten therapeutischen Ansatz dar, weil man mit ihr

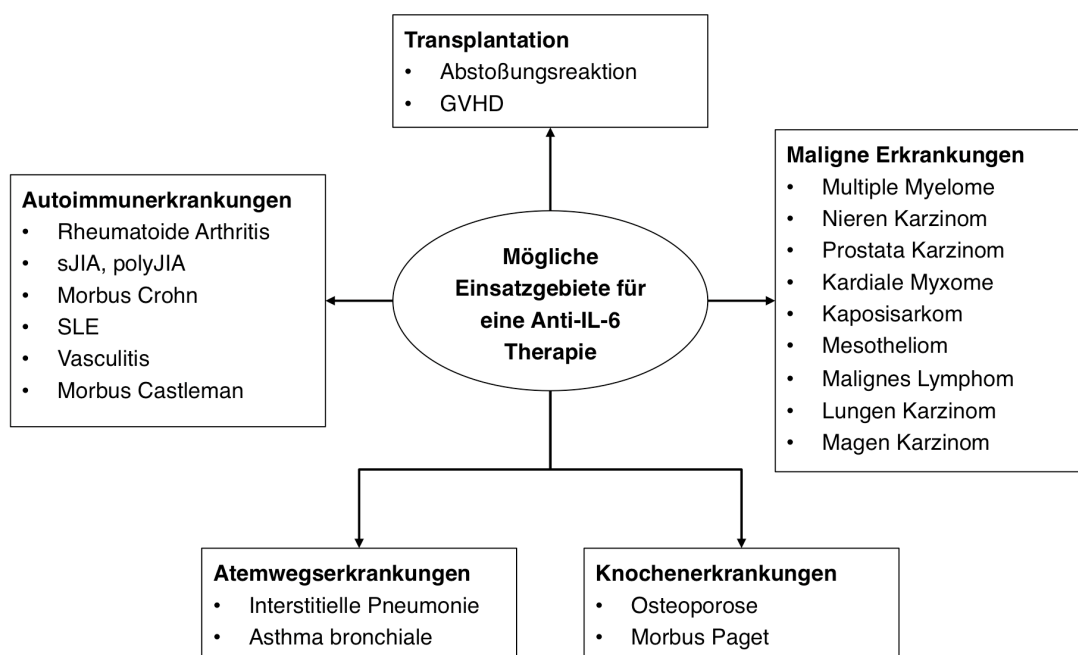


Abbildung 5 – **Mögliche Einsatzgebiete einer IL-6 Blockade** Die Bedeutung für das inflammatorische Geschehen, welche oben beschrieben wurde, verdeutlicht, dass die Blockade von IL-6, als therapeutische Option für manigfache Krankheitsgeschehen denkbar ist. GVHD = Graft versus Host Disease, sJIA = Systemische juvenile idiopathische Arthritis, polyJIA = Juvenile idiopathische Polyarthritis, SLE = Systemischer Lupus erythematodes. Darstellung möglicher Einsatzgebiete in Anlehnung an [147]

sowohl das klassische Signaling, als auch das Transsignaling über den sIL-6R hemmen konnte [147]. In der rheumatoiden Arthritis (RA) wird diese therapeutische Möglichkeit schon erfolgreich genutzt [180]. 2003 brachte die Firma Chugai-Pharmaceutical Co Ltd., die japanischen Einheit von Roche-Pharma, den monoklonalen Antikörper Tocilizumab (*Actemra*[®]) zur Behandlung der RA auf den Markt [181]. Tocilizumab ist ein humanisierter Interleukin-6 Rezeptor Antikörper, der sowohl den Signalweg über den membrangebundenen, als auch den löslichen Rezeptor hemmt [180]. Trotz der beachtlichen Erfolge, die mit Tocilizumab erzielt werden, kann das Medikament nicht als unkritisch bewertet werden. So besteht der Verdacht, dass die IL-6 Blockade als unerwünschte Arzneimittelwirkung zu Übergewicht mit der Folge von peripherer Insulinresistenz und Typ II Diabetes mellitus führen kann [115]. Tierexperimentelle Daten zeigen, dass IL-6-defiziente Mäuse zwar vor einigen Autoimmunerkrankungen geschützt sind, aber ein deutliches Übergewicht und eine Insulintoleranz entwickeln [182].

2 Fragestellung der Arbeit

Die hier vorliegende Studie befasst sich mit den Auswirkungen einer selektiven Blockade des Zytokins IL-6 auf die CVB3-induzierte virale Myokarditis im murinen Tiermodell.

Das Zytokin IL-6 ist ein wichtiger Botenstoff in der für die Initiierung der inflammatorischen Antwort auf infektiöse Pathogene. Es spielt eine wesentliche Rolle sowohl in der frühen Induktion der kardialen Immunreaktion als auch beim Übergang von angeborener zu erworbener Immunität und der Auslösung der Akut-Phase in der Leber. Ferner stimuliert IL-6 die Aktivierung und Differenzierung von B-Zellen, T-Zellen und Makrophagen während der kardialen Inflammation. Die inflammatorische Reaktion und ihre Folgen sind der maßgebliche Prädiktor für Folgeschäden nach einer stattgefundenen Infektion des kardialen Gewebes. Die Blockade von IL-6 wird bereits in der antiinflammatorischen Behandlung der rheumatoiden Arthritis erfolgreich eingesetzt. Diese Arbeit soll im Hinblick auf eine Übertragbarkeit für die Behandlung der Myokarditis folgenden Fragen nachgehen:

- Hat die Blockade von IL-6 eine Auswirkung auf die Ausprägung der Myokarditis?
- In wie weit beeinflusst IL-6 inflammatorische Prozesse (Immunzellinfiltration, Zytokinexpression, Regulation von Adhäsionsmolekülen, kardiale Apoptose) nach viraler Infektion?
- Beeinflusst die Blockade von IL-6 das kardiale Remodelling nach CVB3-Infektion?
- Führt eine Blockade des Zytokins IL-6 zu einer besseren kardialen Funktion nach viraler Myokarditis und Verbesserung der Prognose?

3 Material und Methoden

Im folgenden Teil werden die verwendeten Materialien und die angewandten Methoden der vorliegenden Arbeit beschrieben. Zunächst werden die allgemeinen Spezifika der Studie, wie das Studiendesign und die Kriterien der Versuchstierhaltung aufgeführt. Im Anschluss hieran sollen die Infektion mit CVB3 und Applikation des IL-6-Rezeptorantikörper MR16-1 (IL6RAB) sowie die operativen Maßnahmen und die Charakterisierung der hämodynamischen Funktion mittels Konduktanzkatheter-Verfahren (KKV) beschrieben werden. Hierauf folgen die molekularbiologischen Methoden, welche die immunhistochemischen Färbeprozesse und die Quantifizierung diverser mRNA-Produkte mittels quantitative real time PCR (qPCR) beinhalten. Den experimentellen Abschluss bilden die Zellkulturversuche. Abschließend werden die statistischen Verfahren zur Auswertung der erhobenen Parameter dargestellt.

Alle Versuche wurden nach den Richtlinien des US Nationalinstituts für Gesundheit – „Guide for the Care and Use of Laboratory Animals“, veröffentlicht durch die US Nationalinstitut für Gesundheit (NIH) Publikationsnummer: 85-23, überarbeitet 1985, durchgeführt. Das Versuchsvorhaben (Antragsnummer: G0126/12) wurde am 28.06.2012 durch das Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin (LaGeSo) Berlin genehmigt.

3.1 Studiendesign

Um die Bedeutung einer selektiven IL-6-Blockade bei der CVB3-induzierten viralen Myokarditis zu evaluieren, wurden ausschließlich Mäuse des Stammes C57BL/6j ($n = 40$) verwendet, welche randomisiert zu den folgenden vier Gruppen zugeteilt wurden:

Tabelle 5 – **Das Gruppendesign der verwendeten Tiere.** Tabelle 5 zeigt die Aufteilung der Tiere im Versuchablauf. Die Zuordnung zu den Gruppen wurde randomisiert.

Tierstamm	Bezeichnung	Anzahl
C57BL/6j-Kontrollen	Ko	10
C57BL/6j mit IgG-Kontrolle	IgG	10
C57BL/6j, CVB3 infiziert	CVB3	10
C57BL/6j, CVB3 infiziert, mit IL-6 Rezeptorantikörper (IL6RAB)	IL6RAB CVB3	10

Hierbei wurden die Tiere stets unter den gleichen Bedingungen gehalten. Bei den Gruppen CVB3 und IL6RAB CVB3 wurde an Tag 0 eine virale Myokarditis durch Injektion von

CVB3 (Nancy Strain, 5×10^5 Plaque Forming Units (PFU) in 0,2 ml 0,9% Natriumchlorid (NaCl)) ausgelöst. Die Injektion wurde intraperitoneal (i.p.) appliziert. Die Gruppen Ko und IgG erhielten jeweils eine Injektion mit dem gleichen Volumen NaCl 0,9%. Die Interventionsgruppe erhielt zusätzlich eine Behandlung mit einem IL-6 Rezeptorantikörpers. Zur Placebokontrolle dieser Intervention erhielt die Gruppe IgG einen Antikörper ähnlicher Struktur jedoch ohne Wirkung. Sieben Tage *post infectionem* (p.i.) wurden alle Tiere einer hämodynamischen Messung in finaler Narkose zugeführt. Im Anschluss an die Messung wurden die Organe zur weiteren Untersuchung entnommen und umgehend in -80 °C kaltem Stickstoff kryokonserviert.

3.2 Versuchstierhaltung

Die tierexperimentellen Arbeiten der AG Tschöpe werden alle in der Forschungseinrichtung der

Charité Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin
Garystraße 5
14159 Berlin

durchgeführt. In dieser Einrichtung ist durch das Fachpersonal (Tierpfleger, Tierärzte) die tiergerechte Haltung der Versuchstiere gewährleistet. Alle nötigen Geräte und Mittel sind vorhanden, um eine tierschutzgerechte Versorgung der Tiere zu gewährleisten. Die Tiere wurden während des gesamten Versuchs in einem Tierstall der gentechnische Sicherheitsstufe 2 (S2) gehalten. Die betreffenden Räume wurden unter Überdruck gehalten und durften ausschließlich nach gründlicher Händedesinfektion mit Schutzkleidung, Handschuhen, Kopfhülle und Mundschutz von hierzu befugten Personen betreten werden. Die Mäuse wurden auf staubfreiem Weichholzgranulat in Markkronenkäfigen vom Typ II gehalten. Die Raumtemperatur wurde konstant bei 21 °C und einer Luftfeuchtigkeit von 50-60% gehalten. Die Versuchsräume wurden in einem 12-Stunden-Hell-Dunkel-Turnus belichtet. Die Fütterung der Mäuse erfolgte *ad libitum* mit Altromin 1324 Alleinfutter (Altromin GmbH, Lage) und Leitungswasser. Der Gesundheitszustand aller Tiere, wurde zweimal täglich durch das Pflegepersonal und die Experimentatoren sowie durch die monatlichen veterinärmedizinischen Kontrollen überwacht.

3.3 Infektion mit Coxsackievirus B3

In dem vorliegenden Tierversuch wurde das Modell der CVB3-induzierten Myokarditis verwendet. Um diese bei der Maus hervorzurufen, werden dem Tier einmalig 5×10^5 PFU CVB3 (Nancy strain, ATCC VR-30) gelöst in 0,2 ml NaCl 0,9% i.p. injiziert. Bei den jeweiligen

Kontrolltieren erfolgte die gleiche Injektion, jedoch nicht mit Coxsackievirus der Gruppe B (CVB), sondern mit dem identischen Volumen NaCl 0,9% als Kontrolle. Das Virus wurde auf HeLa-Zellen gezüchtet, welche eine gebräuchliche humane Zelllinie für genetische und molekularbiologische Untersuchungen darstellen. „HeLa“ steht für die Anfangsbuchstaben der afroamerikanischen Patientin Henrietta Lacks. Die Zellen wurden 1951 während der Operation ihres Cervixkarzinoms entnommen und werden seitdem aufgrund ihrer hohen Teilungsfrequenz vielfach in der Forschung eingesetzt. Das Virus wurde bis zur Applikation konstant bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

3.4 Interleukin-6 Blockade mit Rezeptor-Antikörper

Um die Auswirkungen einer IL-6-Blockade auf die Entwicklung einer Myokarditis zu untersuchen wurde den Tieren der Gruppe IL6RAB CVB3 an Tag 1 nach erfolgter Myokarditisinduktion $500\text{ }\mu\text{g}$ des monoklonalen IL6RAB i.p. injiziert. Bei dem Antikörper handelt es sich um ein Immunglobulin aus der Ratte, das eine spezifische Affinität zu murinem IL-6 aufweist. Die Firma Chugai Pharma hat uns diesen dankenswerter Weise für dieses Projekt zur Verfügung gestellt. Die Gruppe IgG erhielt ein fast identisches Immunglobulin der Klasse G (IgG), jedoch ohne die Spezifität für IL-6.

3.5 Messung der hämodynamischen Funktion

3.5.1 Konduktanzkatheter-Messtechnik

Die physikalischen Vorüberlegungen zur Konduktanzkatheter-Technik, wie sie in dieser Arbeit vorgestellt werden, basieren im Weitesten auf den Arbeiten von Baan und Nielsen [183, 184]¹. Grundlage dieser Technik ist die unterschiedliche Leitfähigkeit von Geweben. Als Konduktanz wird der Kehrwert des elektrischen Widerstandes (R) bezeichnet. Durch einen Katheter, der in den linken Ventrikel eingeführt wird, kann die Leitfähigkeit des Blutes, welches sich im linken Ventrikel befindet messbar gemacht werden. Der Konduktanzkatheter hat an der Spitze zwei Elektrodenpaare, von denen das äußere Paar, ein konstantes elektrisches Signal generiert. Das innere Paar misst die entstandene Potentialdifferenz. Hierbei wird die gemessene Gesamtkonduktanz jedoch durch die Konduktanz des umliegenden Gewebes (Muskelgewebe, Lungengewebe, Fett) überdimensional vergrößert. Um die Leitfähigkeit der umgebenden Gewebe aus der Messung zu korrigieren, bedarf es einer Messung der parallelen Konduktanz (G^p), die mittels einer definierten Kontrollflüssigkeit (NaCl 10%) ebenfalls aufgezeichnet und im Nachgang subtrahiert wird. Formel 1 stellt die Errechnung des Korrekturvolumens (V_c) dar, welches durch die parallele Konduktanz in die Messung eingeht.

¹Der Übersicht halber wird die Quelle aller Informationen des folgenden Abschnitts zu Beginn angegeben und im Text nicht an der einzelnen Stelle wiederholt

$$V_c = \left(\frac{1}{\alpha}\right) \left(\frac{L^2}{\sigma_b}\right) \times G^p \quad (1)$$

Hierbei ist α eine dimensionslose Konstante zur Volumenkallibration. L bezeichnet die Entfernung der Elektroden zueinander, σ_b die Leitfähigkeit des Blutes und G^p die gemessene parallele Konduktanz. Um das linksventrikuläre Volumen ($V(t)$), welches sich über die Zeit ändert, darzustellen, wird die parallele Konduktanz von der Gesamtkonduktanz ($G(t)$), gemessen über die entsprechende Zeit, durch die Formel 2 subtrahiert.

$$V(t) = \left(\frac{1}{\alpha}\right) \left(\frac{L^2}{\sigma_b}\right) \times G(t) - V_c \quad (2)$$

Zusätzlich verfügt der Katheter über eine Drucksonde zwischen den Elektroden, die in Echtzeit die Druckschwankungen während des Herzzyklus aufzeichnet.

3.5.2 Narkose

Alle Tiere wurden zur Messung der hämodynamischen Funktion in eine finale Narkose versetzt. Hierzu wurde gewichtsadaptiert (0,8-1,2 g/kg Urethan + Burpenorphin) eine i.p. Injektion 30 min vor dem operativen Eingriff verabreicht. Die Narkosetiefe wurde durch Induktion eines Schmerzreizes überprüft. Bei Bedarf wurde die Dosis um 10% der Initialdosis erhöht. Bei suffizienter Narkosetiefe wurde das Tier auf einer Operationsunterlage fixiert. Die Intubation erfolgte in Rückenlage mit einem flexiblen Kunststofftubus, der unter Sicht in die Trachea vorgeschoben wurde. Zur Bestätigung der erfolgreichen Intubation wurde eine Sichtprüfung der respiratorabhängigen Thoraxbewegungen initial und unter der Operation durchgeführt. Die Ventilation erfolgte mechanisch mittels einer Beatmungsmaschine (Rodent Ventilator Typ 7025, Ugo Basile, Comerio VA, Italien) durch Raumluft mit einem Tidalvolumen von 6,5 ml/kg des Körpergewichts bei einer Beatmungsfrequenz von 200 Hub/min.

3.5.3 Operationstechnik und chirurgisches Vorgehen

Bei sicherer Intubation und nach erfolgter Testung auf Analgesie erfolgte die Rasur des OP-Gebietes im Bereich des Halses. Der Hautschnitt wurde in kraniokaudaler Richtung gesetzt, um die Halsgefäße darzustellen. Halsmuskulatur und Speicheldrüsen wurden stumpf nach lateral präpariert um die rechte Arteria carotis communis freizulegen. Hierbei wurde darauf geachtet Blutungen zu vermeiden, um die hämodynamische Situation nicht zu beeinträchtigen. Bei auftretenden Blutungen wurden diese durch Elektrokoagulation gestoppt. Mit Mikroinstrumentarium wurde der 1,2 french Konduktanzkatheter (Scisense Inc., Ontario, Canada) über die Arteria carotis communis retrograd durch Aorta, Aortenklappe und den linken Vorhof in den linken Ventrikel eingeführt. Die Lage des Katheters konnte durch die Echtzeitdarstellung der Druck-Volumen-Verhältnisse an der Katheterspitze zu jedem Zeitpunkt überprüft werden. Nach korrekter Platzierung erfolgte die Punktion der linken Vena

jugularis interna zur Applikation einer hypertonen NaCl-Lösung, was für die Kallibration des Konduktanzkatheters notwendig ist.

3.5.4 Erheben von Körper-, Herz- und Lungengewicht

Alle Tiere wurden unmittelbar vor Applikation der Narkosemittel gewogen. Direkt im Anschluss zur Konduktanzkatheter-Messung wurde die Präparation der bereits evaluierten Tiere durchgeführt, um zeitliche Verzögerungen zwischen Messung und Präparation zu vermeiden. Das Gewicht des linken Ventrikels wurde nach Entfernen von rechtem Ventrikel und Vorhöfen erhoben. Anschließend wurde das Herzgewebe in flüssigem Stickstoff eingefroren. Das Gewicht der Lungen wurde unmittelbar nach Präparation erhoben und anschließend getrocknet um das reine Gewebegewicht zu erhalten.

3.5.5 Messung der linksventrikulären Funktion mittels Druck-Volumen-Kurven

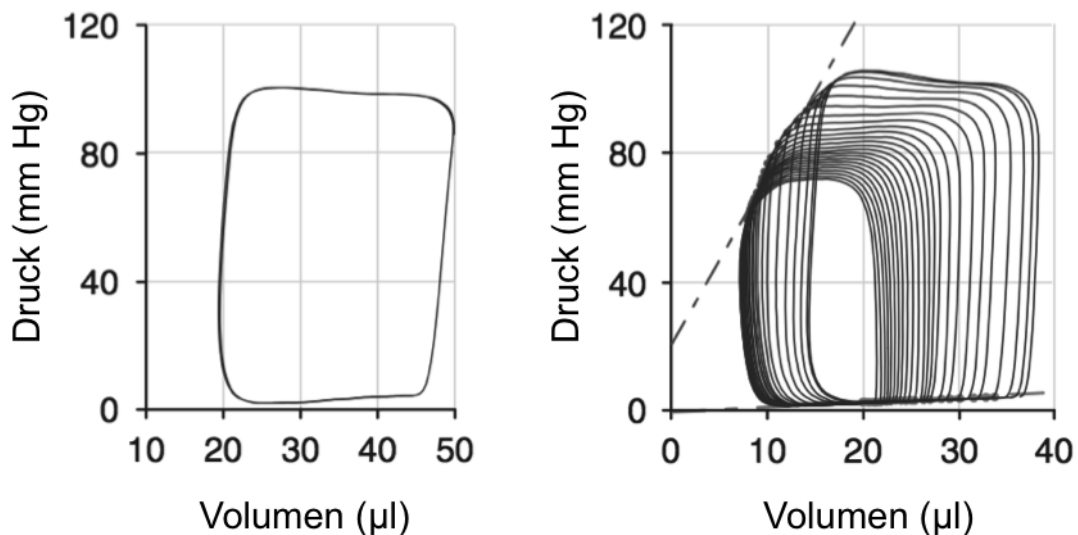


Abbildung 6 – **PV-Kurven einer gesunden Maus in Ruhe und bei Vorlastreduktion** Die Graphen zeigen die Druck-Volumen Verhältnisse einer gesunden Maus im linken Ventrikel in Ruhe (steady state) und bei Vorlastreduktion durch Okklusion der Vena cava inferior (VCO). Graphen abgeändert nach [185]

Bei korrekter Lage des Katheters erfolgte die Aufzeichnung der kardialen Funktion in drei Schritten. Zunächst wurde die Basispumpfunktion des linken Ventrikels in Form von Ruhekurven (Steady States) aufgezeichnet. Hiervon wurden zu Beginn der Aufzeichnung drei Intervalle von jeweils 5 s aufgezeichnet. Die Aufzeichnung aller Messdaten wurde in Apnoe durchgeführt, um sie nicht respirationsbedingt zu beeinflussen. Zur Kallibration des Katheters bzw. zur Ermittlung der parallelen Konduktanz wurde über die Vena jugularis interna ein 10 µl Bolus 10% NaCl-Lösung infundiert. Gleichzeitig wurden die Druck-Volumen (PV)-Kurven im Zustand der Apnoe aufgezeichnet. Zur Evaluation der vorlastunabhängiger

Parameter wurde zusätzlich die Vena-Cava-Okklusion (VCO) angewandt. Hierzu wurde das Abdomen eröffnet und die Vena cava inferior aufgesucht. Wieder im Zustand der Apnoe wurde das Gefäß für 5 s mittels einer Gefäßklemme komprimiert und das Herz so von der natürlichen Vorlast befreit (Abbildung 6).

3.5.6 Parameter der globalen Herzfunktion

Herzfrequenz (HR) Die HR beschreibt die Anzahl der vollständigen Herzzyklen bzw. Herzschläge während einer Minute. Sie ist ein essentieller Parameter zur Beurteilung der kardialen Funktion. Die Einheit ist min^{-1} oder Schläge/Minute. Eine Steigerung der Herzfrequenz geht zu Lasten der Diastolendauer, was die Sauerstoffversorgung des Myokards kompromittiert.

Maximaler linksventrikulärer Druck (P_{max}) Der maximale Druck, mit dem der linke Ventrikel während der Systole das Blut in die Aorta auswirft wird P_{max} genannt. Er stellt ein verlässliches Maß für die systolische Funktion insbesondere der Kontraktionskraft dar und wird in mmHg angegeben.

Schlagvolumen (SV) Das SV beschreibt das Volumen, welches während der Systole aus dem linken Ventrikel in die Aorta ausgeworfen wird. Es wird in μl angegeben und errechnet sich aus der Subtraktion des linksventrikulären enddiastolischen Volumens (LVEDV) und des linksventrikulären endsystolischen Volumens (LVESV) (Formel 3). Das SV stellt einen wichtigen Wert zur Beurteilung der kardialen Funktion dar, ist jedoch um das Körpergewicht korrigiert.

$$SV = LVEDV - LVESV \quad (3)$$

Schlagarbeit (SW) Die Schlagarbeit oder SW ist die Arbeit, die das Herz während der Systole aufbringt, um das Blut in die Aorta auszuwerfen. Im hämodynamischen PV-Diagramm entspricht dies, der von der Kurve eingeschlossenen Fläche. Die SW errechnet sich aus dem Produkt von SV und Mittlerer Arterieller Druck (MAP) (Formel 4). Sie wird angegeben in $\mu l \times mmHg$ angegeben.

$$SW = SV \times MAP \quad (4)$$

Ejektionsfraktion (EF) Die EF beschreibt das SV im Verhältnis zum Gesamtvolumen des linken Ventrikels und wird in Prozent dessen angegeben. Es errechnet sich aus dem prozentualen Anteil des ausgeworfenen Volumens im Vergleich zum EDV (Formel 5).

$$EF = \frac{LVEDV - LVESV}{LVEDV} \times 100 \quad (5)$$

Herzeitvolumen (CO) Das CO stellt dasjenige Blutvolumen dar, welches während einer Minute vom linken Ventrikel in die Aorta ausgeworfen wird. Es wird in $\mu\text{l}/\text{min}$ angegeben und errechnet sich aus dem Produkt von SV und HR.

3.5.7 Parameter der systolischen Herzfunktion

Linksventrikuläre endsystolisches Volumen (LVESV) Das endsystolische linksventrikuläre Volumen (LVESV) beschreibt das Volumen, welches zum Ende der Systole noch im linken Ventrikel verbleibt. Es wird in μl angegeben und dient neben der Errechnung globaler hämodynamischer Parameter als einer der wichtigsten Orientierungspunkte bei der Beurteilung der systolischen Funktion. Bei reduzierter systolischer Funktion steigt das LVESV an, während das CO abnimmt.

Maximale linksventrikuläre Druckerhöhungsgeschwindigkeit (dP/dt_{max}) Die dP/dt_{max} ist ein aussagekräftiger Parameter zur Bestimmung der linksventrikulären Kontraktilität. Sie errechnet sich durch die erste Ableitung der Druckerhöhungskurve während der Systole und gibt den maximalen Druckerhöhung im linken Ventrikel an. Die dP/dt_{max} ist damit ein wichtiger Wert zur Beurteilung der systolischen Funktion.

Linksventrikulärer endsystolischer Druck (LVESP) Der LVESP beschreibt den Druck im linken Ventrikel zum Ende der systolischen Phase. Er wird in mmHg angegeben und dient gemeinsam mit der dP/dt_{max} zur Bewertung der systolischen Funktion. Dieser Druck entspricht in etwa dem endsystolischen arteriellen Blutdruck.

3.5.8 Parameter der diastolischen Herzfunktion

Linksventrikuläres enddiastolisches Volumen (LVEDV) Das enddiastolische linksventrikuläre Volumen (LVEDV) beschreibt das Volumen, welches zum Ende der Diastole im linken Ventrikel verbleibt. Es wird wie alle Volumenparameter bei murinen Versuchen in μl angegeben.

Maximale linksventrikuläre Druckabfallgeschwindigkeit (dP/dt_{min}) Die dP/dt_{min} ist der ausschlaggebende Parameter zur Untersuchung der linksventrikulären Relaxation. Sie beschreibt den maximalen Druckabfall im linken Ventrikel bezogen auf die Zeit. Die dP/dt_{min} beschreibt die gesamte diastolische Funktion, wohingegen Zeitkonstante der isovolumetrischen Relaxation (τ) explizit die Frühdiastole abbildet.

Zeitkonstante der isovolumetrischen Relaxation (τ) Die Zeitkonstante der isovolumetrischen Relaxation (τ) beschreibt den Druckabfall im linken Ventrikel während der isovolumetrischen Relaxation des Myokards. Er gibt Auskunft über die frühdiastolische Funktion und gilt als vorlastunabhängiger Parameter für die aktive Relaxation. τ stellt die Zeit zwischen

Endsystole und dem Erreichen von 10 mmHg oberhalb von LVEDV in ms dar und wird durch die Methode des *least square exponential fitting* errechnet (Formel 5) [186].

$$P(t) = P_0 e^{-\frac{t}{\tau}} + P_\infty \quad (6)$$

Hierbei entspricht $P(t)$ dem linksventrikulären Druck während der isovolumetrischen Relaxation, P_0 stellt eine Konstante für die Amplitude dar, t ist die Zeit nach dP/dt_{\min} , τ ist die Zeitkonstante des linksventrikulären Druckabfalls und P_∞ entspricht der Asymptote des linksventrikulären Drucks bei $V = 0$. Je größer der Wert für τ ist, desto länger braucht das Myokard zur Relaxation und desto gestörter ist die diastolische Funktion.

Linksventrikulärer enddiastolischer Druck (LVEDP) Der LVEDP ist der Druck, welcher zum Ende der Diastole noch im linken Ventrikel herrscht. Der Wert gibt – in Abgrenzung zu τ – Auskunft über die späte diastolische Funktion des Herzens. Je höher er ist, desto schlechter ist die Funktion.

Ventrikelsteifigkeitskonstante (β) Die Ventrikelsteifigkeitskonstante (β) ist ein wichtiger Parameter zur Errechnung der ventrikulären Steifigkeit beispielsweise nach fibrotischen Prozessen oder auch nach kardialer Ischämie. Sie errechnet sich aus der enddiastolischen PV-Beziehung während einer transienten Vorlastreduktion der Vena cava.

3.6 Histologie und Immunhistochemie

3.6.1 Anfertigung von Gefrierschnitten

Für die immunhistochemischen Färbemethoden wurden Schnittpräparate des linken Ventrikels angefertigt. Um das Gewebe im Kryostat (Mikrotom HM560, Fisher Scientific, Walldorf, DE) zu schneiden, muss dieses zunächst in ein Medium aus wasserlöslichen Glykolen und Harzen (Tissue-Tek) eingebettet werden, welches durch Kälte fest wird und das Gewebe stabil umgibt. Der Schneideblock wurde auf der Schnellgefriereinheit des Kryostat platziert und mit einer dünnen Schicht Tissue-Tek bestrichen. Bei Gefrieren der untersten Schicht wurden die -80 °C kalten Gewebeproben in das gefrierende Medium getaucht und mit konzentrischen Kreisen vollständig eingebettet. Der Kryostat verfügt über eine Objektkühlung, die das eingebettete Gewebe samt dem Schneideblock bei einer Temperatur von -11 °C hält und eine Messerkühlung, die zusätzlich auf -21 °C eingestellt wurde. Das Objekt wird zum Schneiden automatisch in 5 μm Abständen auf das Messer zu gefahren. Mit einem Super-Frost-Objektträger können die gewonnenen Schnitte dann aufgrund des Temperaturunterschiedes von Glas zu Präparat einfach von der Schneidefläche aufgenommen werden. Die Schnitte wurden so aufgenommen, dass auf einem Objektträger Schnitte verschiedener Ebenen sind. Es wurden jeweils 40 Objektträger mit jeweils 2 Tieren und 6 Präparaten pro Tier angefertigt. Zur Fixierung wurden die Schnitte für zehn Minuten in eiskaltes Aceton

getaucht. Bis zur Färbung lagerten die Präparate bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Zwei Objektträger für die HE-Färbung wurden nicht fixiert und lagerten bei Raumtemperatur.

3.6.2 HE-Färbung

Die HE-Färbung ist ein weit verbreitetes Verfahren zur vergleichbaren Übersichtsfärbung von Geweben. Sie stellt Zellstrukturen, Zellverteilung, die Kern-Plasma-Relation und das Färbeverhalten der einzelnen Kompartimente übersichtlich dar und ermöglicht im speziellen Fall der Färbung von Herzschnitten die Einordnung in den Myokarditis-Score.

Zur Anfärbung der Präparate wurde, wie in Tabelle 6 beschrieben, vorgegangen. Die Gewebeschnitte wurden nach Erstellung am Kryostat für 10 min in 10% gepuffertem Formalin fixiert. Anschließend wurde zwei Mal gespült, um das Fomalin zu entfernen. Hierzu wurde destilliertes Wasser (Aqua dest.) verwendet. Zur Anfärbung der Kerne wurden die Objektträger für 5 s in Hämalaun-Lösung nach Mayer getaucht und im Anschluss für 10 min mit Leitungswasser gespült. Hierauf folgte die Anfärbung des Zytoplasmas mit Eosin, wozu die Objektträger wieder für 5 s in den Farbstoff getaucht wurden. Die Entwässerung erfolgte zunächst durch zweifache Spülung mittels 90%-igem Ethanol und zusätzlich durch zwei minütiges Tauchen in absolut reinstem Ethanol (abs. Ethanol). Der Alkohol wurde durch ein 5 min Tauchbad in Xylol entfernt. Zur Haltbarmachung der Präparate wurden sie mit dem, auf Xylol basierenden Eindeckmedium Vitro CludTM der Firma R. Langenbrinck eingedeckt.

Tabelle 6 – **Verfahren der HE-Färbemethode** Protokoll der Hämalaun-Eosin-Färbung an unfixierten, luftgetrockneten Kryoschnitten, die bei Raumtemperatur gelagert wurden.

Vorgang	Lösung	Zeit
Fixieren	10% gepuffertes Formalin	10 min
Waschen	Aqua dest.	2× Spülen
Färbung der Kerne	Hämalaun nach Mayer	5 s
Bläuen der Kerne	Leitungswasser	10 min
Färben Zytoplasma	Eosin	5 s
Entwässern	90% Ethanol	2× Spülen
Entwässern	abs. Ethanol	2 × 2 min
Waschen	Xylol	2 × 5 min
Eindecken	Vitro Clud TM	

3.6.3 Einordnung in den Myokarditis Score

Im Anschluss an die Färbung wurden die Schnitte mikroskopisch untersucht und mit Hilfe des Myokarditis Score bewertet. Das maßgebliche morphologische Kriterium zur Bestimmung des Myokarditisgrades ist die Ausbreitung des entzündlichen Infiltrats, welches mit dem umliegenden Gewebe in Bezug gesetzt wird. Hierbei können fünf Grade unterschieden werden:

Grad 0 = kein entzündliches Infiltrat nachweisbar

Grad 1 = vereinzelt Entzündungszellen zwischen Kardiomyozyten sichtbar

Grad 2 = > 100 Entzündungszellen pro Gesichtsfeld

Grad 3 = > 10% der Fläche eines Gesichtsfeldes ist entzündliches Infiltrat

Grad 4 = > 30% der Fläche eines Gesichtsfeldes ist entzündliches Infiltrat

3.6.4 Theoretischer Hintergrund der Immunhistochemie

Die Immunhistochemie ist eine weithin etablierte Methode zum spezifischen Nachweis von Oberflächenantigenen. Sie beruht auf der antigenspezifischen Bindung mit einer sehr hohen Affinität. Definierte Antikörper, die auf Gewebeschnitte aufgetragen werden, können so Oberflächenantigene detektieren. Die Oberflächenstrukturen auf den Zellen der Präparate stellen die Zielantigene dar, welche mit Antikörpern (Tabelle 7), die spezifisch für dieses Antigen sind, binden. Als Sekundärantikörper wird ein Antikörper verwendet, der gegen den FC-Teil des Antikörpers der Spezies gerichtet ist, in der der antigenspezifische Primärantikörper hergestellt wurde. Der Sekundärantikörper kann entweder biotinyliert sein und wird in einem dritten Inkubationsschritt über Streptavidin an das Enzym gebunden (ABC-Methode), welches dann den Farbumschlag katalysiert. Andererseits kann der Sekundärantikörper auch über eine Dextrakette mit dem Enzym verbunden sein (EnVision-Methode). Hierdurch kann ein dritter Inkubationsschritt gespart werden. Im Rahmen dieser Studie haben wir die Avidin-Biotin-Komplexmethode (ABC), die EnVisionTM-Methode sowie das spezielle Verfahren der DeadEndTM Colorimetric TUNEL Methode verwandt.

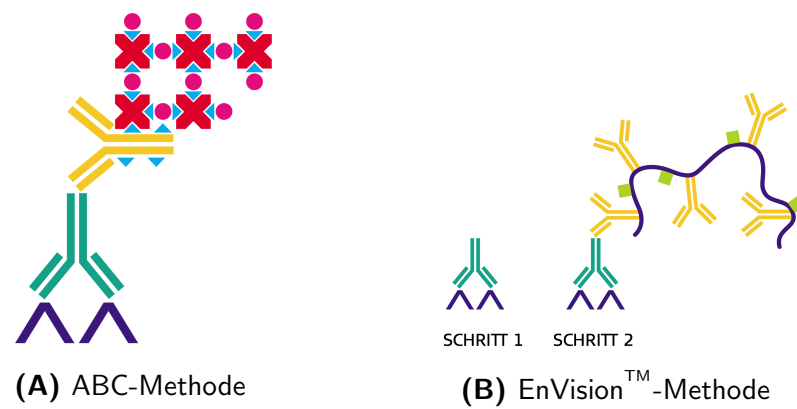


Abbildung 7 – **Schema der ABC und EnVision™-Methode** Bei der ABC-Methode (a) wird das Antigen (violett) vom Primärantikörper (grün) detektiert, welcher seinerseits mit dem biotinylierten (blau) Sekundärantikörper (gelb) bindet. Dieser reagiert mit dem AB-Komplex (rot/blau), welcher bereits das biotinylierte Enzym HRP (pink) enthält. Durch Zugabe von Carbazol erfolgt der Farbumschlag. Bei der EnVision™-Methode (b) wird ein Primärantikörper (grün) auf die Schnitte gegeben und bindet an das Antigen (violett). Im zweiten Schritt bindet das Dextranpolymer, welches circa 10 Moleküle Sekundärantikörper (gelb) und 70 Enzymmoleküle (grün) enthält. Abbildung aus [187]

Tabelle 7 – **Verwendete Antikörper für die Immunhistochemie** Gezeigt sind die zur Färbung verwendeten Antikörper unter Angabe von Firma, Spezies, Verdünnung (VDG), Methode und des ggf. benutzten Zweitantikörpers.

Primärantikörper					Sekundärantikörper					Methode
Target	Spezies	Firma	Nummer	VDG	Target	Spezies	Firma	Nummer	VDG	
α -SMA	Kanin.	Abcam	Ab5694	1:200	Anti-Kanin.	Ziege	Dako	K4003	—	EnVision
CD3	Ziege	Santa-Cruz	SC-1127	1:75	Anti-Ziege	Kanin.	Vector-Labs	PK-6105	1:250	ABC
CD8	Kanin.	Bioss	bs-0648R	1:150	Anti-Kanin.	Ziege	Dako	K4003	—	EnVision
CD68	Kanin.	Bioss	bs-0649R	1:150	Anti-Kanin.	Ziege	Dako	K4003	—	EnVision
CD80	Hamster	Pharmingen	553766	1:50	Anti-Hamst.	Ziege	Dianova	127-065-160	1:200	ABC
ICAM	Hamster	Pharmingen	550287	1:100	Anti-Hamst.	Ziege	Dianova	127-065-160	1:200	ABC
IL-6	Kanin.	GenTex	GTX 26672	1:400	Anti-Kanin.	Ziege	Dako	K4003	—	EnVision
Koll I	Kanin.	Chemicon	AB765P	1:500	Anti-Kanin.	Ziege	Dako	K4003	—	EnVision
Koll III	Kanin.	Calbiochem	234189	1:200	Anti-Kanin.	Ziege	Dako	K4003	—	EnVision
MMP-2	Kanin.	Chemicon	AB19167	1:75	Anti-Kanin.	Ziege	Dako	K4003	—	EnVision
MMP-9	Kanin.	Chemicon	AB19016	1:200	Anti-Kanin.	Ziege	Dako	K4003	—	EnVision
RACK1	Kanin.	Abcam	AB72483	1:400	Anti-Kanin.	Ziege	Dako	K4003	—	EnVision

3.6.5 Avidin-Biotin-Komplex-Methode (ABC-Methode)

Die ABC-Methode ist eine sehr weit verbreitete Methode unter den immunhistochemischen Färbungen. Sie beruht auf der hohen Affinität von Avidin zu Biotin ($K_M=10^{-15}\text{M}$). Das Hühnereiweiß Avidin besitzt vier Bindungsstellen für Biotin, kann jedoch aufgrund der molekularen Ausrichtung nicht vier Biotin-Moleküle binden [187].

Um ein Verlaufen der Reagenzien zwischen den Gewebeschnitten zu vermeiden, wurden die einzelnen Schnitte, nach dem Auftauen, mit dem Diamantschleifer umrandet. Zu Beginn des Verfahrens, wurden die Präparate für 5 min in TBS inkubiert um sie an das Puffermilieu zu gewöhnen und eine gleichmäßiges Benetzen der Schnitte zu gewährleisten. Zur Blockierung der gewebesigenen Peroxidase, welche die Färbung falschpositiv beeinflussen kann, wurden die Präparate in 0,075% H_2O_2 in TBS inkubiert. Es folgte ein Waschgang für 2×5 min, in Tris-Puffer (TBS) zur Reinigung der Schnitte von H_2O_2 . Zum Absättigen elektrostatischer Ladungen und der Blockierung des endogenen Avidins erfolgte eine Inkubation für 30 min bei Raumtemperatur in $1 \times \text{TBS}/1\%$ bovinem Serumalbumin (BSA) gelöst in 10% Normalse-rum (NS), versetzt mit 4 Tropfen Avidin/ml. Die Anlagerung des Primärantikörpers verlief parallel zur Blockade des endogenen Biotins. Hierzu wurden die Schnitte für 60 min dem Primärantikörper ausgesetzt. Dies erfolgte durch Applikation von 100 μl Lösung/Färbefeld in welcher der Primärantikörper in TBS/BSA versetzt mit 4 Tropfen Biotin/ml gelöst war. Es schloss sich ein Waschvorgang mit TBS für 2×5 min an. Nun erfolgte die Bindung des biotinylierten Sekundärantikörpers, an den Primärantikörper, welcher an das Antigen im Präparat gebunden hatte. Hierzu wurden erneut 100 μl Lösung/Färbefeld appliziert, in welcher bei diesem Durchgang der Sekundärantikörper ebenfalls in TBS/BSA gelöst war. Nach 60 min Inkubation des Sekundärantikörpers erfolgte ein Waschvorgang. Zur Bildung des AB-Komplexes und Bindung an den Sekundärantikörper erfolgte die Applikation von 100 μl ABC-Reagenz/Färbefeld mit anschließender Inkubation von 30 min bei RT. Nach erneutem Waschen wurde zur Detektion der HRP Carbazol + 100 μl 30% H_2O_2 für 12 min auf der Schüttelplatte in vollkommener Dunkelheit appliziert.

Abschließend wurden die Präparate mit Hämalaun nach Mayer durch Tauchen gegengefärbt und mit Glyceringelantine eingedeckt. Zur Negativkontrolle der Färbung wurde bei jeweils zwei Feldern eine Pufferlösung anstelle des Primärantikörpers verwendet. Hierdurch konnte eine Reaktion des zweiten Antikörpers gegen unspezifische Antigene ausgeschlossen werden. Zur Kontrolle der Blockierung der gewebesigenen Peroxidase wurden beide Antikörper durch Pufferlösungen ersetzt.

3.6.6 EnVision™-Methode

Die EnVision™-Methode ist ein Polymer-gekoppeltes Nachweisverfahren zur Färbung von Oberflächenstrukturen, die zur Unterscheidung von Zellen, beispielsweise eines Zellinfiltrates,

Tabelle 8 – **Protokoll der ABC-Methode** Modifiziertes Protokoll der Firma DakoCytomation Corporation, Carpinteria, CA, USA. In Anlehnung an [187] TBS = Tris-Puffer, BSA = Bovines Serum Albumin, RT= Raumtemperatur

Vorgang	Lösung	Zeit/Temperatur
Waschen	TBS	5 min
Peroxidaseblockierung	0,075% H ₂ O ₂ in 1 × TBS	7 min
Waschen	1 × TBS	5 min
Absättigen elektrostatischer Ladung	10% NS in 1 × TBS, 1% BSA + 4 Tropfen Avidin/ml	30 min/RT
Anlagerung Primärantikörper	100 µl/Färbefeld Primärantikörper in 1 × TBS, 1% BSA + 4 Tropfen Biotin/ml	60 min/RT
Waschen	1 × TBS	2 × 5 min
Anlagerung Sekundärantikörper	100 µl/Färbefeld Sekundärantikörper in 1 × TBS, 1% BSA	60 min/RT
Waschen	1 × TBS	2 × 5 min
Bildung AB-Komplex	ABC-Reagenz	30 min/RT
Waschen	1 × TBS	2 × 5 min
Substratumsatz	Carbazol + 100 µl 30% H ₂ O ₂	12 min auf Schüttelplatte in Dunkelheit
Waschen	1 × TBS	2 × 5 min
Bläuen der Kerne	Hämalaun nach Mayer	Tauchen
Spülen	Leitungswasser	10 s
Konservierung	Glyceringelantine	

dienen sollen. In der vorliegenden Arbeit wurden allerdings vor allem Kollagene und MMPs mit dieser Methode nachgewiesen.

Wie auch bei der ABC-Methode wurden die einzelnen Schnitte nach dem Auftauen, um ein Verlaufen der Reagenzien zwischen den Gewebeschnitten zu vermeiden, zunächst mit dem Diamantschleifer umrandet. Es folgte eine Gewöhnung an das Puffermilieu für 5 min in PBS. Anschließend wurde zur Blockierung der endogenen Peroxidase für 7 min in 0,075% H_2O_2 in PBS inkubiert. Nach erneutem Waschen schloss sich die Anlagerung des Primärantikörpers durch 60 min Inkubation des gelösten Antikörpers in PBS/10% fetalem Kälberserum (FCS) an. Vor dem zweiten Schritt, der Inkubation mit der EnVision™-Polymerlösung, erfolgt ein erneuter Waschvorgang für 2×5 min mit PBS. Die gebrauchsfertige EnVision™-Polymerlösung wurde für 30 min appliziert. Nach der Inkubation wird für 2×5 min gewaschen, bevor zum Substratumsatz für 10 min Carbazol + 100 μl 30% H_2O_2 hinzu gegeben wird.

Nach letztmaligem Waschen für 5 min in PBS wurden die Präparate mit Hämalaun nach Mayer durch Tauchen gegengefärbt und, nach spülen mit Leitungswasser, mit Glycerin-gelantine eingedeckt. Zur Verifizierung für die H_2O_2 -Blockade und der Spezifität des Sekundärantikörpers wurden Negativkontrollen mitgeführt.

3.6.7 DeadEnd™ Colorimetric TUNEL-Assay

Zum Nachweis apoptotischer Zellen in den Myokardschnitten, fand die DeadEnd™ Colorimetric TUNEL-Methode der Firma Promega Corporation, Mannheim, DE Anwendung. Hierbei wird fragmentierte DNA aus zugrunde gegangenen Zellen mittels biotinylierter Nucleotidverbindungen detektiert. Diese wird durch die Rekombinante Terminal Deoxynucleotidyl-Transferase (rTdT) an das 3' Ende der DNA-Fragmente angeheftet. Durch Zugabe von Streptavidin HRP wird der Farbumschlag katalysiert. Das genaue Protokoll der Färbung ist in Tabelle 10 dokumentiert.

Zu Beginn der Färbung wurden die Schnitte zur Gewöhnung an das Puffermilieu nach Auftauen für 5 min in PBS inkubiert. Es folgte eine Fixierung der Schnitte in 10% gepuffertem Formalin für 15 min. Nach zweifachem Waschen für jeweils 5 min in PBS zur Entfernung des Formalins wurden die Schnitte zur Demaskierung der Oberfläche für 30 min in eine Proteinase-K-Lösung gegeben. Diese wurde nach Inkubation ebenfalls durch zweifaches Waschen entfernt. Nach Demaskierung erfolgte ein erneuter Fixierungsschritt mit 10% gepuffertem Formalin diesmal jedoch nur für für 5 min. Nach Entfernung des Formalins durch erneutes Waschen, erfolgte die Gewöhnung an das neue Puffermilieu durch 10 min Inkubation in Äquilibriumspuffer. Zum Nachweis fragmentierter nukleärer DNA-Segmente aus apoptotischen Zellen wurden 100 μl rTdT-Reaktionsmix pro Färbefeld appliziert und für 60 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Zum Beenden der Reaktion wurden die Schnitte für 15 min in SSC-Puffer getaucht und anschließend zwei Mal gewaschen. Dies dient der Entfernung ungebundener biotinylierter Nucleotide von der Schnittoberfläche. Nun erfolgte die Blockierung

Tabelle 9 – **Protokoll der EnVision™-Methode** Modifiziertes Protokoll der Firma DakoCytomation Corporation, Carpinteria, CA, USA. In Anlehnung an [187], PBS=Phosphat-Puffer, FCS=fetales Kälberserum

Vorgang	Lösung	Zeit
Gewöhnung an Puffermilieu	1 × PBS	5 min
Peroxidaseblockierung	0,075% H ₂ O ₂ in 1 × PBS	5 min
Waschen	1 × PBS	5 min
Anlagerung Primärantikörper	Primärantikörper in 1 × PBS, 10% FCS	60 min
Waschen	1 × PBS	2 × 5 min
Anlagerung EnVision-Antikörper	EnVision™-Polymerlösung	30 min
Waschen	1 × PBS	2 × 5 min
Substratumsatz	Carbazol + 100 µl 30% H ₂ O ₂	10 min
Waschen	1 × PBS	2 × 5 min
Kernfärbung	Hämalaun nach Mayer	30 s
Spülen	Leitungswasser	10 s
Eindecken	Glyceringelantine	

der endogenen Peroxidase durch Tauchen der Schnitte in 0,15% H_2O_2 in PBS für 3 – 5 min. Nach zweimaligem Waschen mit PBS erfolgte die Bindung von Streptavidin an das Biotin der Nucleotide während eines 30 min Inkubationsschrittes. Anschließend wurde das Streptavidin durch erneutes Waschen von den Schnitten entfernt. Die Sichtbarmachung der Färbung erfolgte durch Zugabe von Carbazol, welches den Farbumschlag des HRP-gelabelten Streptavidins katalysiert. Durch ein letztmaliges Waschen wurde das überschüssige Carbazol wieder entfernt.

Wie bei den beiden anderen Färbungen wurden die Kerne durch Applikation von Hämalun nach Mayer für 5 s gegengefärbt und mit Leitungswasser gespült. Eingedeckt wurden die Präparate mit Glyceringelantine. Es wurden Positiv- und Negativkontrollen bei jeder Färbereihe mitgeführt. Zur Negativkontrolle wurde das rTdT-Reaktionsreagenz weggelassen.

3.6.8 Auswertung der histologischen Präparate

Die Auswertung der histologischen Präparate wurde mit einem Leica DMRB Lichtmikroskop bei 200-facher Vergrößerung durchgeführt. Die Schnitte wurden ohne Kenntnis der Gruppenzugehörigkeit meanderförmig durchsucht und pro Schnitt ca. 20 Gesichtsfelder fotografiert und digitalisiert. Zur quantitativen Auswertung der gefärbten Schnitte wurde die farbkodierte digitale Bildanalyse mit dem Programm Lucia G Version 3.51 von Imaging Laboratories durchgeführt. Hierbei wird nach Auswahl der Messfläche der Hintergrund markiert und in einem zweiten Schritt von Herzmuskelgewebe subtrahiert, um Färbeartefakte nicht in die Auswertung einfließen zu lassen. In der so markierten Messfläche findet sich ausschließlich Herzmuskelgewebe. Hierin wird dann mit einem jeweils spezifischen Makro für flächenhafte bzw. punktförmige Antigene die positiv gefärbte Fläche im Verhältnis zum umliegenden Gewebe errechnet. Schließlich werden die Daten aus den einzelnen Gesichtsfeldern summiert und der Anteil von Antigen zu Muskel bei flächenhaften Antigenen als Flächenfraktion in Prozent dargestellt. Punktförmige Antigene werden als Zellen/ mm^2 angegeben. Das Verfahren der verblindeten Auswahl der Gesichtsfelder und der computergestützten Auswertung ermöglicht ein weitgehend Untersucher-unabhängiges Ergebnis und stärkt die Objektivität der Daten.

3.7 RNA-Aufbereitung

Für die RNA-Isolation im Rahmen der vorgelegten Studie wurde, im Fall der Expressionsuntersuchungen in kardialen Geweben, zunächst eine Extraktion der RNA durchgeführt. Hierfür wurde das Reagenz Trizol[®] der Firma Invitrogen verwendet. Für die anschließende Aufreinigung und den DNA-Verdau, wie sie sowohl mit der gewonnenen RNA aus den Gewebeschnitten, wie auch mit dem Material der Zellkulturversuche durchgeführt wurde, verwendeten wir das RNeasy[®] Mini-Kit und die DNase I von Qiagen. Für die Reverse Transkription fand

Tabelle 10 – **Protokoll der DeadEnd™ Colorimetric TUNEL-Methode** Modifiziertes Protokoll der Firma Promega Corporation, Mannheim, DE zur Detektion apoptotischer Zellen auf Kryoschnitten. PBS=Phosphat-Puffer, SSC=Saline Sodium Citrat, RT=Raumtemperatur

Vorgang	Lösung	Zeit/Temperatur
Gewöhnung an Puffermilieu	1 × PBS	2 × 5 min
Fixierung	10% gepuffertes Formalin	15 min
Waschen	1 × PBS	2 × 5 min
Demaskierung	1:500 Proteinase-K in 1 × PBS	30 min
Waschen	1 × PBS	2 × 5 min
Fixierung	10% gepuffertes Formalin	5 min
Waschen	1 × PBS	2 × 5 min
Äquilibrieren	100 µl Äquilibriumspuffer	10 min
Nachweis fragmentierter DNA	100 µl rTdT-Reaktionsmix	60 min/37 °C
Reaktion beenden	1 × SSC	15 min
Waschen	1 × PBS	2 × 5 min
Peroxidaseblockierung	0,15% H ₂ O ₂	3–5 min
Waschen	1 × PBS	2 × 5 min
Bindung von Streptavidin an Biotin	Streptavidin HRP (gelöst in 1:500 PBS)	30 min
Waschen	1 × PBS	2 × 5 min
Substratumsatz	Carbazol + 100 µl 30% H ₂ O ₂	12 min
Waschen	1 × PBS	5 min
Kernfärbung	Hämalaun nach Mayer	30 s
Spülen	Leitungswasser	10 s
Eindecken	Glyceringelantine	

das High-Capacity-Archive Kit von Applied Biosystems, Darmstadt (ABI) Verwendung. Die Protokolle der Hersteller wurden weitestgehend übernommen.

3.7.1 Extraktion von RNA aus kardialen Gewebe

Zur Isolation der RNA aus dem kardialen Gewebe wurde zunächst das Gewebestück in ein, mit 400 µl Trizol[®] gefülltes, Eppendorfgefäß gegeben und mittels des Pellet Pestle homogenisiert. Im Anschluss hieran wurden erneut 400 µl Trizol[®] hinzugegeben und die Lösung wurde für 10 min bei Raumtemperatur auf dem Thermomixer bei 1.000 Umdrehungen pro Minute (RPM) inkubiert. Anschließend wurden 160 µl Chloroform in jedes Reaktionsgefäß pipettiert und die Proben für 10–15 s geschüttelt und zusätzlich gevortext. Nach 15 min Zentrifugation bei 4 °C und 12.000 g stellten sich im Reagenzgefäß drei Phasen dar. Die obere klare Phase enthält hierbei die Ribonucleinsäure (RNA), die mittlere weiße Phase enthält die Proteine und die untere rosafarbene Phase enthält die Desoxyribonucleinsäure (DNA). Die obere klare Phase wurde abpipettiert und in ein neues Reagenzgefäß gefüllt. Hierzu wurden 400 µl Isopropanol hinzugegeben und die Probe wurde erneut durchgemischt. Es folgte ein weiterer Inkubationsschritt für 10 min bei Raumtemperatur. Im Anschluss hieran wurden die Proben ein zweites Mal bei 4 °C und 12.000 g zentrifugiert. In diesem Schritt fällt die RNA am Boden des Gefäßes als ein Pellet aus. Der Überstand wurde abpipettiert und verworfen. Zum Lösen der RNA wurde das Pellet in 100 µl RNase freiem Wasser resuspendiert.

3.7.2 Aufreinigung der RNA und DNA-Verdau

Zur Aufreinigung der gewonnenen RNA aus den kardialen Geweben wie auch dem Material aus den Zellkulturversuchen, wurden 350 µl RNeasy Lyse (RLT)-Puffer (enthält 1% Mercapto-Ethanol) und 250 µl abs. Ethanol gegeben und gut durchmischt. Die Bindung der RNA an die Säule des RNeasy-Kits erfolgte durch Hinzugabe der RNA-haltigen Lösung und anschließende 15 s Zentrifugation des Reaktionsgefäßes. Der sich unterhalb des Filters abgesetzte Puffer mit dem Alkohol wurde verworfen. Es folgte ein Waschvorgang wofür 350 µl RW Puffer (RW1) auf die Säule gegeben wurde und eine weitere Zentrifugation bei Raumtemperatur mit 12.000 g für 1 min.

Anschließend wurden 80 µl DNase-Mix (10 µl DNase I + 70 µl RDD-Puffer) auf die Säule gegeben und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es erfolgte ein erneuter Waschvorgang wie oben bereits beschrieben. Hinzu kam ein doppelter Waschvorgang der Säule mit RPE Puffer (RPE). Hiervon werden 500 µl auf die Säule gegeben und für 2 min bei Raumtemperatur mit 9.300 g zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und es erfolgt eine weitere Zentrifugation bei gleicher Geschwindigkeit für 1min zur Trocknung der Säule. Im Anschluss wird die RNA nun mit 30 µl RNase-freiem Wasser von der Säule eluiert. Diese wurde zuvor durch eine Sichtprüfung evaluiert. Die Säule wurde nun bei Raumtemperatur ein letztes Mal für 5 min inkubiert und im Anschluss bei maximaler Geschwindigkeit (16.100 g) abzentrifu-

giert. Die Säulen wurden nach diesem Schritt verworfen und die RNA war gelöst in Wasser im Reaktionsgefäß.

Zur Bestimmung der RNA-Konzentration wurde 1 µl jeder Probe im Nano Drop (Thermo Scientific-PEQLAB Biotechnologie, Erlangen, DE) photometrisch untersucht. Die Werte wurden durch die vom Hersteller mitgelieferte Software Nanodrop-1000 Version 3.1.2 in ng/ml ausgegeben.

3.7.3 Reverse Transkription

Um die gewonnenen RNA-Proben in komplementäre DNA (cDNA) umzuschreiben, wurde eine Reverse Transkription (RT) mittels des High-Capacity-Archive Kits von ABI durchgeführt. 1 µg RNA wurde auf ein Volumen von 10 µl mit RNase-freiem Wasser aufgefüllt und die RNA wurde bei 70 °C im PCR-Cycler denaturiert. Nach einer Zentrifugation wurden 10 µl des 2-fach konzentrierten Mastermixes (Tabelle 11) hinzupipettiert. Die Umschreibung der RNA in cDNA erfolgte im PCR-Cycler nach folgendem Programm: Zunächst wurden die Proben für 10min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss hieran erfolgte eine zwei-stündige Inkubation bei 37 °C. Zum Schluss wurden die Proben auf 4 °C heruntergekühlt. Im Anschluss an die RT wurden die gewonnene cDNA mit 80 µl RNase freiem Wasser verdünnt und bei –20 °C gelagert.

Tabelle 11 – **Zusammensetzung des RT-Mastermix** Mengenangaben zum Pipettieren des 2-fach konzentrierten Mastermixes für die Reverse Transkription (Mengenangaben für 1 Reaktion).

Reagenz	Volumen
10 × RT-Puffer	2 µl
25 × dNTP-Mix	0,8 µl
10 × Random-Primer	2 µl
Multiscribe RT (50 U/µl)	1 µl
RNase-freies Wasser	4,2 µl

3.8 Quantifizierung von RNA durch Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die qPCR ist eines der modernsten Verfahren der Molekularbiologie zur Echtzeit-Quantifizierung von DNA-Sequenzen in Testreihen. Um neben DNA-Sequenzen auch RNA messbar zu machen, bedient man sich der Umschreibung von RNA-Sequenzen in cDNA, wie zuvor

beschrieben. Zur Begriffsklärung sei gesagt, dass die Abkürzung RT-Polymerase Kettenreaktion (PCR), welche für das seit langem etablierte Verfahren der Kombination aus reverser Transkription zur Umschreibung von RNA zu cDNA und klassischer PCR steht, häufig missbräuchlich für den Begriff real time PCR verwendet wird, was synonym für die qPCR gebraucht wird. Um diesen Irrtum zu umgehen, soll im weiteren Verlauf von der qPCR als Abkürzung für quantitative PCR gesprochen werden und um den Zusatz qRT-PCR erweitert werden, wenn es sich um eine Kombination der Verfahren reverse Transkription und quantitativer PCR handelt.

3.8.1 Die quantitative TaqMan[®] PCR

Die qPCR wurde erstmals 1991 beschrieben [188]. Sie erlaubt es, im Unterschied zur klassischen PCR Methode, den Anstieg des PCR Produkts im Verlauf der Amplifizierung zu beobachten. Dies ermöglicht eine sehr präzise Analyse weniger zuvor festgelegter Gene. Erreicht wird dieser Vorteil gegenüber der klassischen PCR durch die Zugabe eines Fluoreszenzfarbstoffes. Die Zunahme der Fluoreszenz im Verlauf der Amplifikation ist hierbei direkt proportional zum entstandenen Amplifikat. Dies wiederum ist proportional zur ursprünglich eingesetzten Template-Menge an cDNA. Die TaqMan-PCR beruht auf der 5'-Exonuklease-Aktivität der Taq-Polymerase. Diese Polymerase ist ein Produkt des Bakteriums *Thermus aquaticus* (*Taq*) und zeichnet sich durch eine besonders hohe Thermostabilität aus [189]. Die Sonde besteht aus einem Oligonukleotid, an dessen 5'-Ende sich der Reporterfarbstoff Fluorescein (FAM) befindet und das den Quencherfarbstoff Tetramethylrhodamin (TAMRA) am 3'-Ende trägt. Jede Sonde ist zudem phosphoryliert, um eine Extension des 3'-Endes während der Amplifikation zu vermeiden. Solange diese Sonde intakt ist, gibt sie kein fluoreszierendes Signal ab. Dieser Mechanismus beruht auf dem Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer (FRET), welcher dazu führt, dass die Fluoreszenzenergie des Reporterfarbstoffes auf den Quencher übertragen wird und seine Wirkung nicht entfalten kann. Erst wenn die Sonde durch die 5'-Exonuklease-Aktivität der Taq-Polymerase gespalten wird und der Reporterfarbstoff durch räumliche Trennung von Reporter und Quencher frei wird, kommt es zur Fluoreszenz.

Zur Auswertung der gewonnenen Ergebnisse der qPCR werden Threshold-Cycle (C_T)-Werte festgelegt, die den Übergang von Hintergrundsignal zu exponentiellem Anstieg über die Grundlinie darstellen. Diese C_T -Werte des gesuchten Gens werden dann zu einem s.g. Haushaltsgen ins Verhältnis gesetzt. Das Haushaltsgen (hier CDKN1b) ist ein Gen, welches unabhängig von Zelltyp, Zellstadium und weiteren Einflüssen in gleicher Intensität exprimiert wird. Die Subtraktion der C_T -Werte von nachzuweisendem Gen und dem Haushaltsgen wird als ΔC_T bezeichnet und stellt das Ergebnis der Messung dar. Je niedriger der C_T -Wert des gesuchten Gens ist, desto mehr Zielsequenz war in der untersuchten Probe vorhanden. Die Angabe der Genexpression schließlich erfolgt als $2^{-\Delta C_T}$. Alle Amplifikationen wurden doppelt durchgeführt und als Mittelwert angegeben. Zur Negativkontrolle wurden Wells ohne cDNA

geführt. Alle Analysen wurden mit dem Genexpression-Mastermix der Firma Applied Biosystems, Darmstadt (ABI) durchgeführt. Tabelle 12 zeigt die verwendeten Gen Expression Assays mit Angabe der Gen-Assay ID.

Tabelle 12 – **Verwendete Gen Expression Assays der Firma ABI für die TaqMan® PCR**
Dargestellt sind alle bei der TaqMan® PCR verwendeten Gen Expression Assays unter Angabe der Gen Assay ID

Gen	Gen-Assay-ID
CAR	Mm00438361_m1
CDKN1b	Mm00438167_g1
Col1A1	Mm01302043_g1
Col3A1	Mm00802331_m1
IFN- β	Mm00439552_s1
IFN- γ	Mm00801778_m1
IL-1 β	Mm00434228_m1
IL-6	Mm00446190_m1
IL-10	Mm00439616_m1
TNF- α	Mm00439616_m1
18S	Hs99999901_s1

3.9 CVB3-Infektion und Stimulation mit IL-6 in vitro

Zum besseren Verständnis der zellulären Mechanismen der viralen Myokarditis wurde ein funktionelles *in vitro*-Modell etabliert. In diesem Teil der Arbeit wurde die mRNA Expression für IL-6 und TNF- α nach CVB3-Infektion und Stimulation mit rekombinantem IL-6 bei Kardiomyozyten, Fibroblasten und Makrophagen untersucht.

Murine adulte kardiale Fibroblasten aus dem Herzgewebe von zwölf Wochen alten Mäusen wurden in Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM) versetzt mit 20% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin kultiviert. Die Passagezahl der Zellen, für diese Experimente betrug 4 – 8. Die murinen Kardiomyozyten der Zelllinie HL-1 wurden in Claycomb Medium (SAFC Biosciences, Kansas, USA) kultiviert, welches mit 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin, 200 mM L-Glutamin (Biochrom, Berlin, DE) und 10 mM Norepinephrin (Sigma, Steinheim,

DE) als Endkonzentration im Medium versetzt war. Zur Bewertung der Makrophagen kamen die murinen Leukämiezellen der Zelllinie RAW zum Einsatz, welche in RPMI 1640-Medium mit 10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin kultiviert wurden.

Für die Infektionsversuche bzw. die Stimulation mit rekombinantem IL-6 wurden die Zellen auf Zellkulturplatten transferiert. Die Fibroblasten wurden in 12-Well-Platten mit einer Zelldichte von 150.000/Well überführt. Für die HL-1- und die RAW-Zellen wurden 24-Well-Platten verwendet und eine Dichte von 200.000 Zellen/Well bei den HL-1 und 500.000 Zellen/Well bei den RAW-Zellen angestrebt. 24 h vor Beginn der Infektion bzw. Stimulation wurde das Nährmedium ersetzt durch Aushungermedium des jeweiligen Typs mit 0,5% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin.

Für die Infektion verwendet wurde CVB3 (Nancy strain, ATCC VR-30) verwendet, welches in einem Multiplizität der Infektion (MOI)-Verhältnis von 0,5 der Kultur zugeführt wurde. Zur Interaktion von Virus und Zellen erfolgte eine Inkubation im Brutschrank bei 37 °C für 1 h in dem jeweiligen komplett serumfreien Medium. Nach der Infektion wurden die Zellen 2 × mit dem jeweils verwendeten Aushungermedium gewaschen und für weiter 5 bzw. 23 h in Aushungermedium inkubiert. Für die Stimulation wurde analog zur Infektion verfahren, es wurde jedoch anstelle des Virus 10 ng/ml murines IL-6 (PeproTech, Hamburg, DE) in das Aushungermedium gegeben und für den gesamten Zeitraum auf den Zellen belassen. Nicht infizierte bzw. stimulierte Zellen wurden bei allen Versuchen als Kontrollen mitgeführt und exakt gleich zu den infizierten/stimulierten Zellen behandelt.

3.10 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der gewonnenen Daten wurde mit dem Programm Graph Pad Prism in der Version 5.0 durchgeführt. Alle Daten wurden als Mittelwert (MW) \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) dargestellt. Es wurde zunächst auf eine Normalverteilung der Daten getestet. Da die meisten Parameter keine Normalverteilung aufwiesen, wurden die Daten mit dem Mann-Whitney U Test auf Signifikanz hin getestet. Dieser ist von einer Normalverteilung und ungleicher Varianz unabhängig. Statistische Signifikanz wurde für einen P-Wert $< 0,05$ angenommen.

Tabelle 13 – **Verwendete Verbrauchsmaterialien** Dargestellt sind alle bei Studien verwendeten Verbrauchsmaterialien unter Angabe der Bezeichnung bzw. weiterer Spezifikationen und der Bezugsquelle.

Artikel	Bezeichnung/Spezifikationen	Bezugsquelle
Deckgläser	21 × 26 mm	Menzel-Gläser, Braunschweig, DE
Falcon-Tubes	15 ml, 50 ml	Sarstedt, Nürnberg, DE
Feintücher	Kim Wipe lite	Hakle-Kimberley, Mainz, DE
Kryotubes	1,8 ml	Sarstedt, Nürnberg, DE
Injektionskanülen	18 G und 20 G	Braun, Melsungen, DE
Objektträger	Super-Frost Plus	Langenbrinck, Emmendingen, DE
PCR-Tubes	0,2 ml, konischer Deckel	Biozym, Hess. Oldendorf, DE
Pipettenspitzen		Sarstedt, Nürnberg, DE
Reaktionsgefäße	Safe-Lock oder RNase-frei	Sarstedt, Nürnberg, DE
Spritzenvorsatzfilter	Filtergröße 0,2 mm	Biometra, Göttingen, DE
12-Well-Platte		Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
24-Well-Platte		Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE

Tabelle 14 – **Verwendete Laborgeräte** Dargestellt sind alle bei Studien verwendeten Laborgeräte unter Angabe der Bezeichnung bzw. des Typs und der Bezugsquelle.

Laborgerät	Bezeichnung/Typ	Bezugsquelle
Autoklav		Hartmann, Schleswig, DE
Beatmungsgerät	Rodent Ventilator Typ 7025	Ugo Basile, Comerio VA, Italien
Brutschrank	Function Line	Heraeus, Osterode, DE
Druck-Volumen-Amplifier-System	MPVS 300/400	Millar Instruments, Houston, USA
Eismaschine	AF-10	Scotsman, Vernon Hills, USA
Gefrierschrank –20 °C	Economic super	Bosch AG, Stuttgart, DE
Gefrierschrank –80 °C	Nuaire Ultralow Freezer	Zapf Instrumente, Sarstedt, DE
Homogenisator	Pellet Pestle Motor	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
Horizontalschüttler	SM-25	Edmund Bühler, Tübingen, DE
Konduktanzkatheter	1,2 French	Scisense Inc., Ontario, Canada
Kühlzentrifuge 4 °C	Centrifuge 5415R	Eppendorf, Wessling-Berzdorf, DE
Laborwaage, elektronisch	DMS 580	Kern Elektronik, Albstadt, DE
Magnetrühr-/Heizplatte	Ikamag RCT	IKA-Labortechnik, Staufen, DE
Mikroskop	DMBRE	Leica, Wetzlar, DE
pH-Meter	Knick Digital 646	Beyer, Düsseldorf, DE
Photometer	NanoDrop ND1000	Thermo Scientific, Wilmington, USA
Pipetten		Eppendorf, Wessling-Berzdorf, DE
Präzisionswaage		Sartorius, Göttingen, DE
Mikrotom	HM 560	Fisher Scientific, Walldorf, DE
Thermomixer	Comfort	Eppendorf, Wessling-Berzdorf, DE
Thermozykler	Mastercycler gradient	Eppendorf, Wessling-Berzdorf, DE
Tischzentrifuge	Centrifuge 5415 C	Eppendorf, Wessling-Berzdorf, DE
Vortexer	VF2	IKA-Labortechnik, Staufen, DE
Wasserbad	GFL	Burgwedel, DE

Tabelle 15 – **Verwendete Puffer und Chemikalien** Dargestellt sind alle bei Studien verwendeten Puffer und Chemikalien unter Angabe der Bezeichnung bzw. Abkürzung und der Bezugsquelle.

Artikel	Bezeichnung	Bezugsquelle
3-Amino-9-Ethylcarbazol		Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
ABC-Kit		Vector Labs, Burlingame, USA
Aceton		VWR Merck Darmstadt, DE
Ammoniumacetat		VWR Merck, Darmstadt, DE
Ammoniumsulfat		Serva, Heidelberg, DE
Aqua bidest.	Aqua-Spüllösung, steril	Delta Select, Pfullingen, DE
Avidin-Biotin-Blocking-Kit		Vector Labs, Burlingame, USA
Borsäure	für die Molekularbiologie	VWR Merck, Darmstadt, DE
Bovines Serumalbumin	BSA, lyophilisiert	Vector Labs, Burlingame, USA
Buprenorphin		
Calciumchlorid	CaCl ₂ , gekörnt	VWR Merck, Darmstadt, DE
Chloroform		VWR Merck, Darmstadt, DE
Claycomb-Medium		SAFC Biosciences, Kansas, USA
Dako EO 468	Immunhistochemie 2. AK	Dako, Hamburg, DE
DNase I-Set	RNAse-frei	Qiagen, Hilden, DE
Dimethylsulfoxid VWR	DMSO	Merck, Darmstadt, DE
DMEM		A & E Scientific, Pasching, A
EDTA		VWR Merck, Darmstadt DE
Eosin Y		Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
Essigsäure	100% (Eisessig)	VWR Merck, Darmstadt, DE
Ethanol absolut	Dab 9 reinst	VWR Merck, Darmstadt, DE
FCS		Biochrom, Berlin, DE
Glycerol		Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
Hämalaun nach Mayer		VWR Merck, Darmstadt, DE
High Capacity-Kit	cDNA RT Kit	Applied Biosystems, CA, USA

Isopropanol		Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
Kaliumchlorid		VWR Merck, Darmstadt, DE
Kaliumdihydrogenphosphat		VWR Merck, Darmstadt, DE
L-Glutamin	L-Gln	Biochrom, Berlin, DE
Magnesiumchlorid	als Hexahydrat	VWR Merck, Darmstadt, DE
Natriumacetat		VWR Merck, Darmstadt, DE
Natriumcarbonat		VWR Merck, Darmstadt, DE
Natriumchlorid		VWR Merck, Darmstadt, DE
Natriumdihydrogenphosphat		VWR Merck, Darmstadt, DE
Natriumhydroxid	als Plätzchen	VWR Merck, Darmstadt, DE
N,N-Dimethylformamid		VWR Merck, Darmstadt, DE
Norepinephrin		Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
Paraformaldehyd	(PFA)	VWR Merck, Darmstadt, DE
Penicillin/Streptomycin		A & E Scientific, Pasching, A
Protein Assay Kit BCA		Millipore, Billerica, USA
RNeasy Kit	RNA-Extraktion	Qiagen, Hilden DE
RNAse Zap	aktiver RNAse-Inhibitor	Ambion, Austin, USA
RPMI-1640		Biochrom, Berlin, DE
SSC	Saline Sodium Citrat	Promega Corporation, Mannheim, DE
TaqMan Master Mix	Gene Expression Master Mix	Applied Biosystems, CA, USA
Tissue Tek	Einbettmedium	Sakura, Zoeterwoude, NL
Trapanal	Thiopental	Glaxo-Smith, DE
Tris-BASE		VWR Merck, Darmstadt, DE
Tris-HCl		VWR Merck, Darmstadt, DE
Triton X-100		Sigma, Taufkirchen, DE
Trizol LS Reagent	zur RNA-Isolierung	Invitrogen, Karlsruhe, DE
Vitro Clud	Corbit Balsam	R. Langenbrinck, Emmendingen, DE
Wasserstoffperoxid	30% H ₂ O ₂ (v/v), wässrig	Sigma, Taufkirchen, DE

4 Ergebnisse

Im folgenden Teil werden die Ergebnisse der zuvor beschriebenen Methoden, die im Rahmen der vorliegenden Studie erzielt wurden, dargestellt. Teile dieser Ergebnisse wurden bereits in [190] publiziert.

4.1 Schweregrad der viralen Myokarditis

Die Klassifikation der viralen Myokarditis erfolgte im Fall der vorliegenden Studie durch die Erfassung von Körper-, Herz- und Lungengewicht als Parameter für die allgemeine Krankheitsausprägung. Zur Evaluation der inflammatorischen Aktivität im Myokard wurde eine HE-Färbung angefertigt.

Insgesamt zeigten alle Tiere ähnliche Ausgangsgewichte. Die infizierten Tiere (CVB3 und IL6RAB CVB3) wiesen sieben Tage nach Infektion das 0,8-Fache des Körpergewichts ($P < 0,0001$) und einen 6,4-fachen Anstieg im linksventrikulären (LV) Gewicht ($P < 0,0001$) gegenüber den jeweiligen Kontrolltieren (Ko und IgG) auf. Ein signifikanter Unterschied bei den Lungengewichten konnte zwischen infizierten Gruppen (CVB3 und IL6RAB CVB3) und jeweiliger Kontrolle (Ko und IgG) nicht nachgewiesen werden. Bei Körpergewicht, LV-Gewicht und dem Lungengewicht (trocken) bestand ferner kein signifikanter Gewichtsunterschied zwischen den Gruppen CVB3 und IL6RAB CVB3. Das Feuchtgewicht der Lungen war bei den Tieren der Gruppe CVB3 jedoch um den Faktor 1,1 ($P = 0,0432$) im Vergleich zur Gruppe IL6RAB CVB3 erhöht.

Tabelle 16 – **Gewichtsangaben** der Tiere sieben Tage nach viraler Infektion. Alle Angaben in Gramm (g). Die Datensätze wurden als $MW \pm SEM$ ausgewiesen ($\# = P < 0,05$ vs. Ko; $\dagger = P < 0,05$ vs. IgG; $*$ = $P < 0,05$ vs. CVB3).

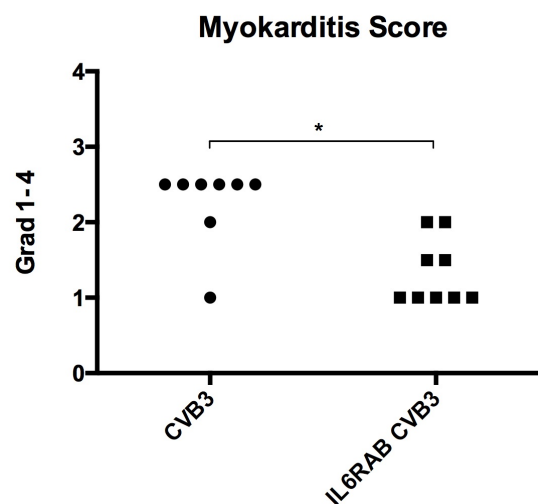
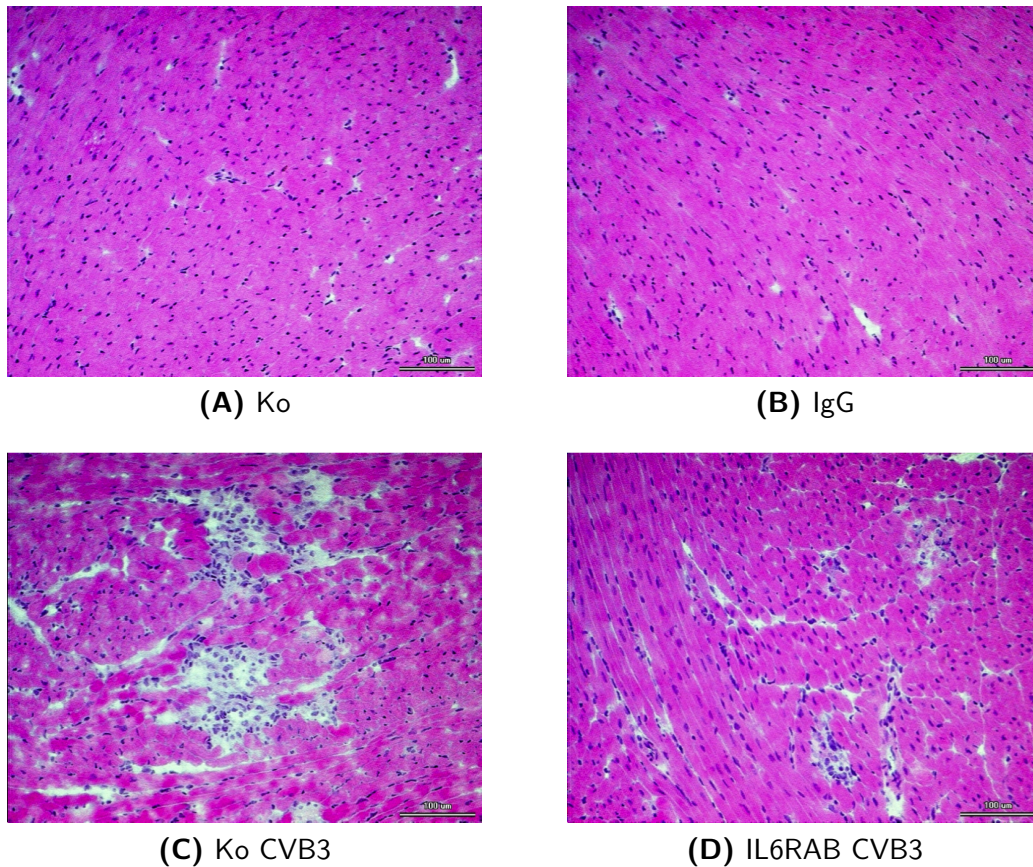
Tiergruppen	Ko	IgG	CVB3	IL6AB CVB3
Körpergewicht	$24,2 \pm 0,3$	$23,5 \pm 0,2$	$19,3 \pm 0,4 \#$	$18,6 \pm 0,7 \dagger$
LV Gewicht	$0,11 \pm 0,005$	$0,11 \pm 0,002$	$0,7 \pm 0,002 \#$	$0,7 \pm 0,006 \dagger$
Lunge (feucht)	$0,12 \pm 0,005$	$0,12 \pm 0,002$	$0,13 \pm 0,004$	$0,12 \pm 0,002 *$
Lunge (trocken)	$0,04 \pm 0,004$	$0,04 \pm 0,003$	$0,04 \pm 0,004$	$0,04 \pm 0,002$

Als Übersichtsfärbung und zur Klassifizierung der Myokarditis wurde eine HE-Färbung angefertigt (Abbildung 8 A-D), welche als Grundlage für die Anwendung des Myokarditis Scores darstellte. Die Tiere der Kontrollgruppen (Ko und IgG) wiesen kein Infiltrat auf und wurden somit mit Grad 0 eingestuft. Die Tiere der unbehandelten Gruppe wiesen nach

Infektion ein deutliches Ausmaß an entzündlichem Infiltrat auf und wurden als Grad 2 - 3 (6 Tiere), Grad 2 (1 Tier) und Grad 1 (1 Tier) eingestuft. Signifikant hiervon unterschied sich die Gruppe IL6RAB CVB3. Sie wurden als Grad 2 (2 Tiere), Grad 1 - 2 (2 Tiere) und Grad 1 (5 Tiere) eingestuft (Abbildung 8 E).

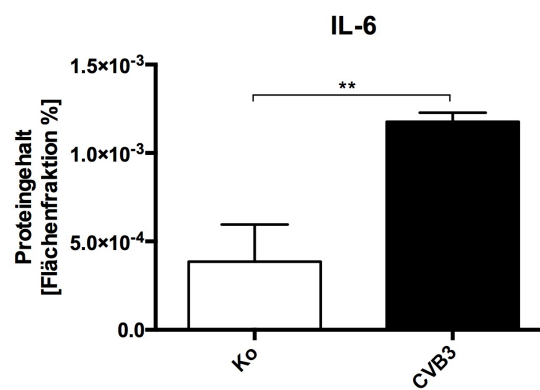
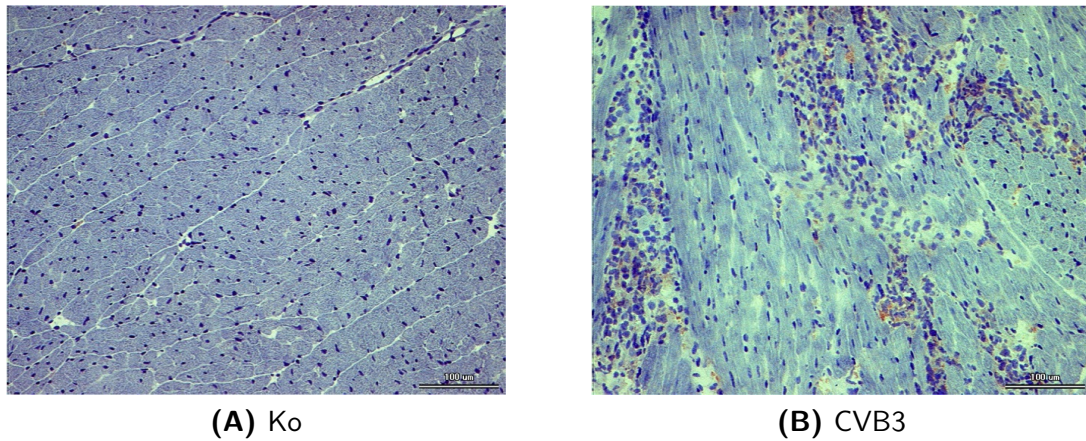
4.2 Myokardiale Expression von IL-6 in vivo

Zur Evaluation der Expression von IL-6 im Myokard nach CVB3 Infektion wurde eine immunhistologische Färbung angefertigt. Detektiert wurde die mRNA-Expression von IL-6 mit einem Antikörper aus dem Kaninchen gegen Maus und mittels der EnVisionTM-Methode sichtbar gemacht. Die nicht infizierte Gruppe Ko wies eine 3,1-fach ($P = 0,0012$) niedrigere IL-6 mRNA-Expression im Vergleich zu CVB3 auf (Abbildung 9).



(E) Semiquantitative Einordnung in den Myokarditis Score

Abbildung 8 – **HE-Färbung und Myokarditis Score** Repräsentative histologische Bilder der Hämalaun-Eosin-Färbung (A-D) im linksventrikulären Gewebe bei einer 200-fachen lichtmikroskopischen Vergrößerung. Die Gruppe IL6RAB CVB3 zeigt ein signifikant reduziertes entzündliches Infiltrat verglichen mit der Gruppe CVB3. Die Gruppen Ko und IgG weisen keine Zeichen für Inflammation auf. Ergänzend dargestellt ist die Einordnung in den Myokarditis Score nach den Graden 0 - 4 in der HE-Färbung (E). Signifikanz (*) wurde für $P < 0,05$ angenommen. Alle Datensätze wurden als $MW \pm SEM$ ausgewiesen.



(C) Ergebnis der digitalen farbkodierten Bildanalyse

Abbildung 9 – **Färbung IL-6** Repräsentative immunhistologische Bilder der Färbung von IL-6 in kardialen Präparaten der Maus, sieben Tage nach CVB3 Infektion bei 200-facher lichtmikroskopischer Vergrößerung (A+B). Ergänzend dargestellt ist das Ergebnis der digitalen farbkodierten Bildanalyse der Färbung (C). Pro Tier wurden 3 Schnitte mit jeweils 20 Gesichtsfeldern pro Schnitt analysiert. Signifikanz (*) wurde für $P < 0,05$ angenommen. Alle Daten sind als $MW \pm SEM$ angegeben.

4.3 Myokardiale Inflammation

Zur Analyse der Veränderungen auf Proteinebene und in Folge auf zellulärer Ebene im Verlauf der viralen Myokarditis wurden im Rahmen der vorliegenden Studie verschiedene Genexpressions-Experimente sowie immunhistologische Untersuchungen durchgeführt. Untersucht wurde die Expression verschiedener Zytokine, die eine Schlüsselposition im Prozess der Inflammation einnehmen. Um die Bedeutung der frühen T-Zell-Reaktion explizit zu evaluieren, wurde ein gesonderter Versuch mit kürzerer Versuchsdauer (3 Tage) durchgeführt (Abbildung 16). Die wichtigsten Immunzellen sowie ICAM wurden 7 Tage nach Infektion immunhistologisch detektiert (Abbildung 11 - 15).

4.3.1 Zytokinexpression im myokardialen Gewebe

Um die Auswirkungen einer IL-6 Rezeptorblockade auf die interzellulären Mechanismen besser zu verstehen, haben wir die wichtigsten Zytokine, die im Rahmen der Pathogenese der viralen Myokarditis eine Schlüsselposition einnehmen, genauer untersucht. Hierzu wurde die mRNA-Expression der Zytokine TNF- α , IL-1 β , CCL2, IL-10, IFN- β und TGF- β sieben Tage nach Infektion mittels TaqMan[®] PCR im kardialen Gewebe quantifiziert. Die erhobenen Werte der jeweiligen Sequenzen wurden zur Expression des Haushaltsgens CDKN1B ins Verhältnis gesetzt. Die IL-6 Rezeptorblockade führte zu einer Reduktion der TNF- α -Expression um das 2,4-fache ($P = 0,04$). Die Expression von IL-1 β war um das 3,2-fache ($P = 0,003$) reduziert. Für das antiinflammatorische Zytokin IL-10 sowie die proinflammatorischen Zytokine CCL2, IFN- β und TGF- β konnten keine signifikanten Unterschiede als Auswirkung der IL-6 Rezeptorblockade ausgemacht werden (Abbildung 10).

4.3.2 Regulation von Adhäsionsmolekülen

Zur Initiation der transendothelialen Migration von Immunzellen werden verschiedene Oberflächenmoleküle auf der Membran der kardialen Endothelzellen exprimiert. In dieser Studie wurde im Besonderen das Intercellular Adhesion Molecule (ICAM) näher untersucht. Abbildung 11 zeigt das Ergebnis der immunhistochemischen Färbung von ICAM im kardialen Gewebe. Neben der basalen Expression des Moleküls in den Gruppen Ko und IgG, fällt eine deutlich erhöhte Expression nach Infektion in den Gruppen CVB3 und IL6RAB CVB3 auf. Darüber hinaus ist ein signifikanter Unterschied zwischen den infizierten Gruppen festzustellen. Die Expression bei den behandelten Tieren (IL6RAB CVB3) ist im Vergleich zu der Kontrollgruppe CVB3 2,3-fach reduziert ($P = 0,0007$).

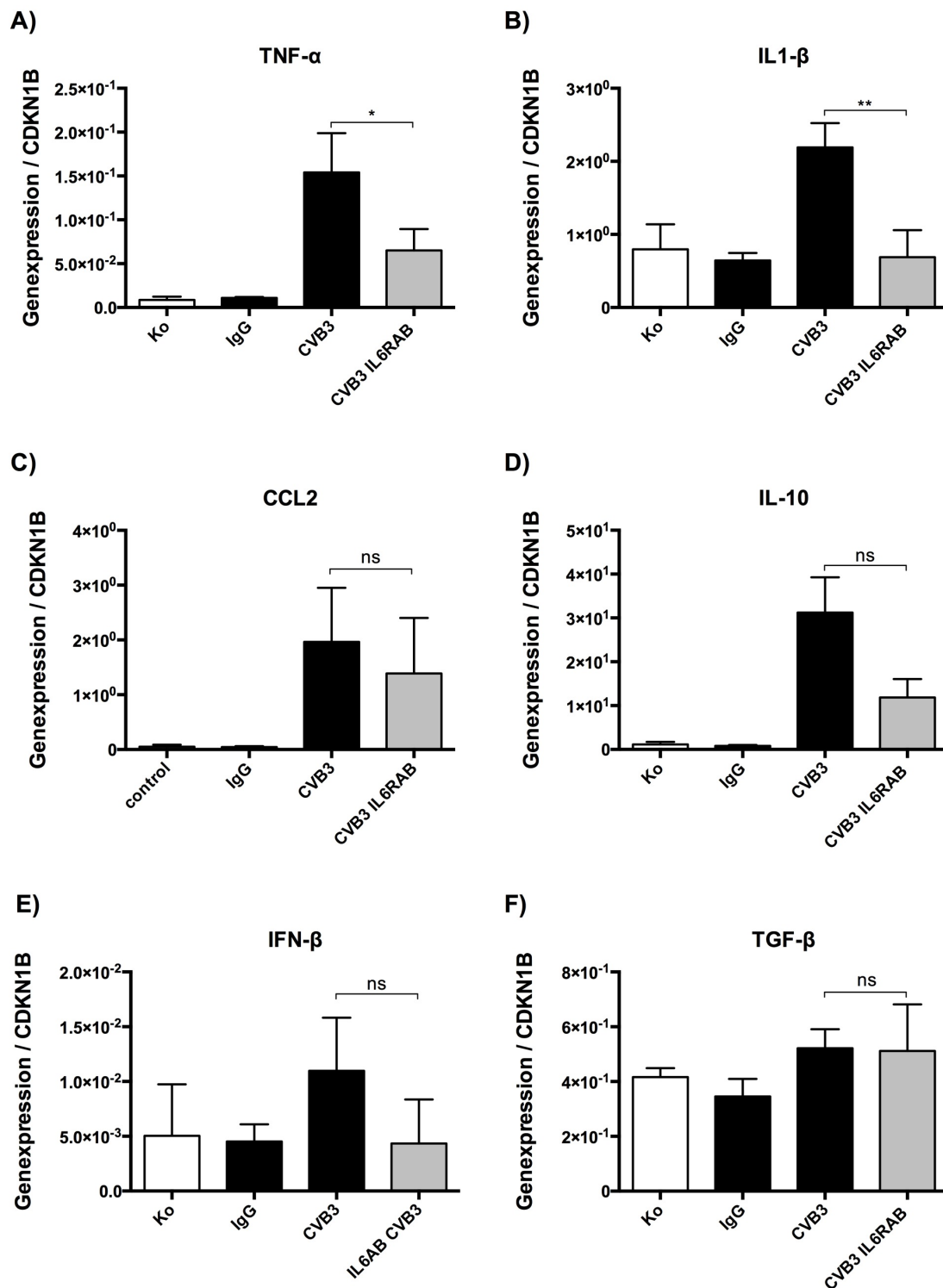
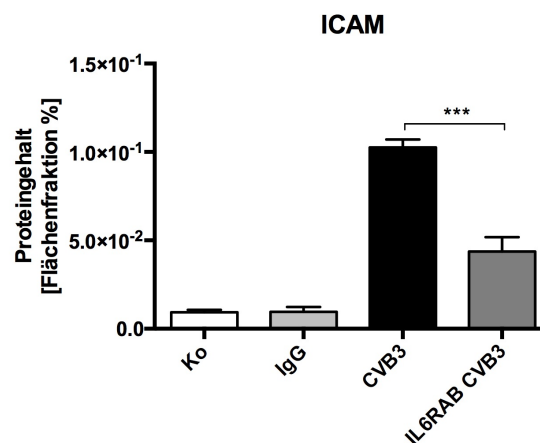
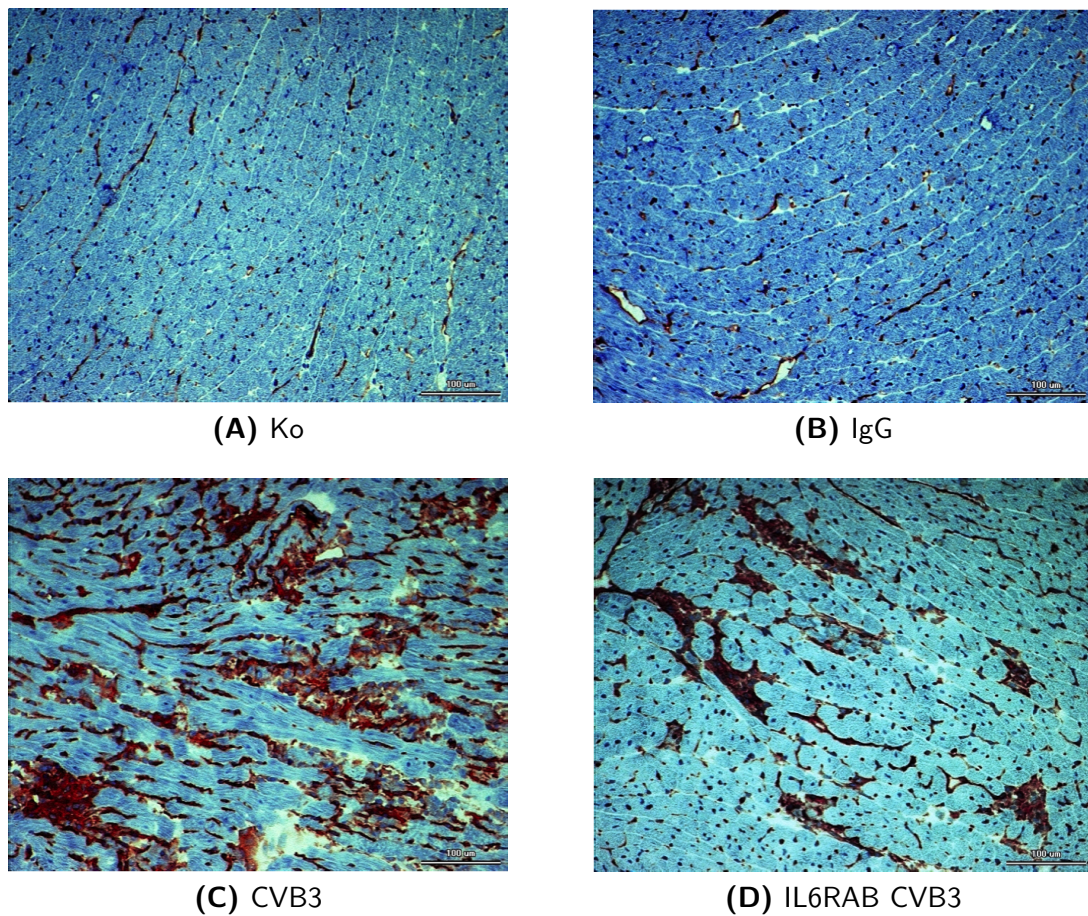


Abbildung 10 – **Kardiale Zytokinexpression** Dargestellt ist die kardiale Zytokinexpression der maßgeblich an der Inflammation beteiligten Botenstoffe aus kardialen Gewebeproben. TNF- α (A), IL-1 β (B), CCL2 (C), IL-10 (D), IFN- β (E) und TGF- β (F). Die Werte wurden zur Expression von CDKN1B ins Verhältnis gesetzt. Alle Datensätze basieren auf 6 Werten pro untersuchter Probe und wurden als MW \pm SEM ausgewiesen. * = P < 0,05; ** = P < 0,01; *** = P < 0,001; ns = nicht signifikant



(E) Ergebnis der digitalen farbkodierten Bildanalyse

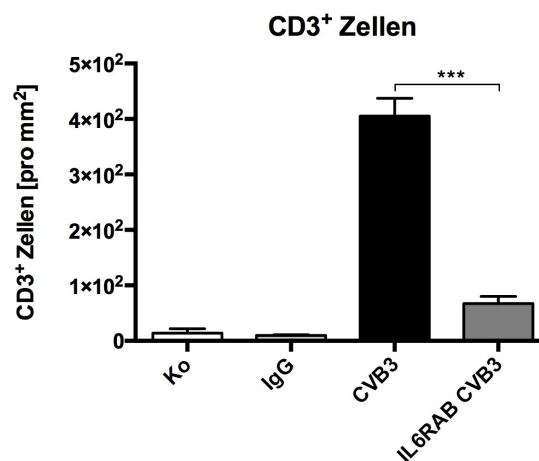
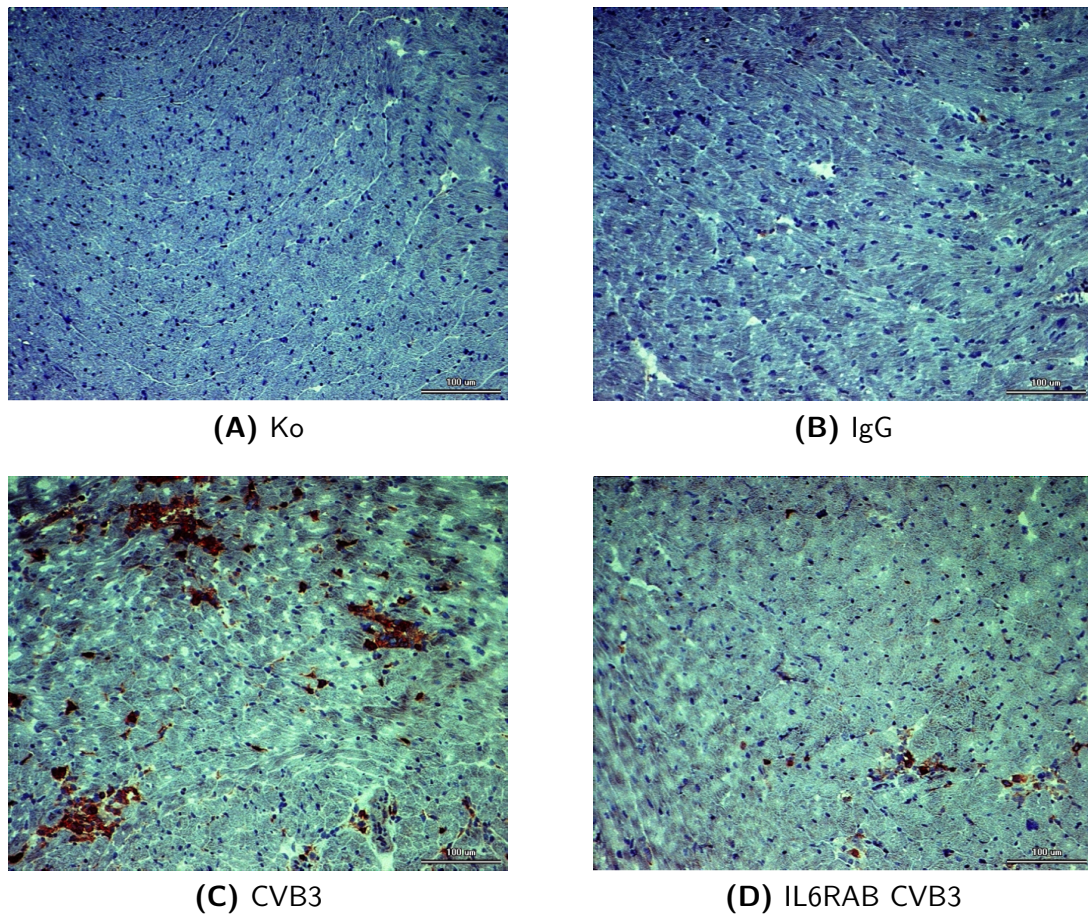
Abbildung 11 – **Färbung ICAM** Repräsentative immunhistologische Bilder der Färbung von ICAM in kardialen Präparaten der Maus, sieben Tage nach CVB3 Infektion bei 200-facher lichtmikroskopischer Vergrößerung (A-D). Ergänzend dargestellt ist das Ergebnis der digitalen farbkodierten Bildanalyse der Färbung (E). Pro Tier wurden 3 Schnitte mit jeweils 20 Gesichtsfeldern pro Schnitt analysiert. Signifikanz (*) wurde für $P < 0,05$ angenommen. Alle Daten sind als $MW \pm SEM$ angegeben.

4.3.3 Immunezellinfiltration

Als wichtiger Hinweis für das Ausmaß der Inflammation allgemein und zur Differenzierung zellulärer Prozesse, wurde das kardiale Immunezellinfiltrat mittels immunhistologischer Färbungen genauer analysiert. Die rein flächige Dimension des kardialen Zellinfiltrats als maßgeblicher Marker für den Grad der Myokarditis wurde bereits bei der HE-Färbung dargestellt. Zur genaueren Differenzierung der einzelnen Populationen wurden spezifische Oberflächenmoleküle für T-Zellen allgemein (CD3⁺), zytotoxische T-Zellen (CD8⁺), Makrophagen (CD68⁺) und aktivierte B-Zellen (CD80⁺) gefärbt.

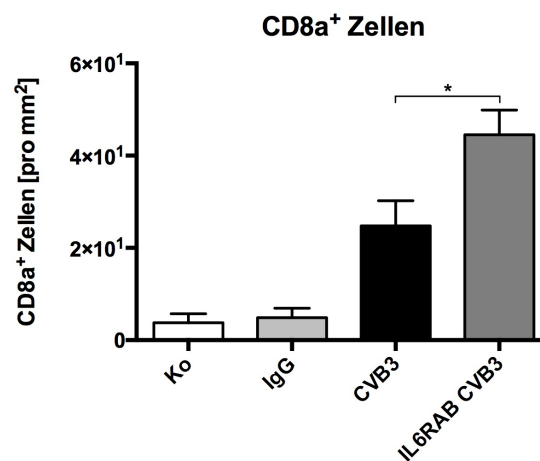
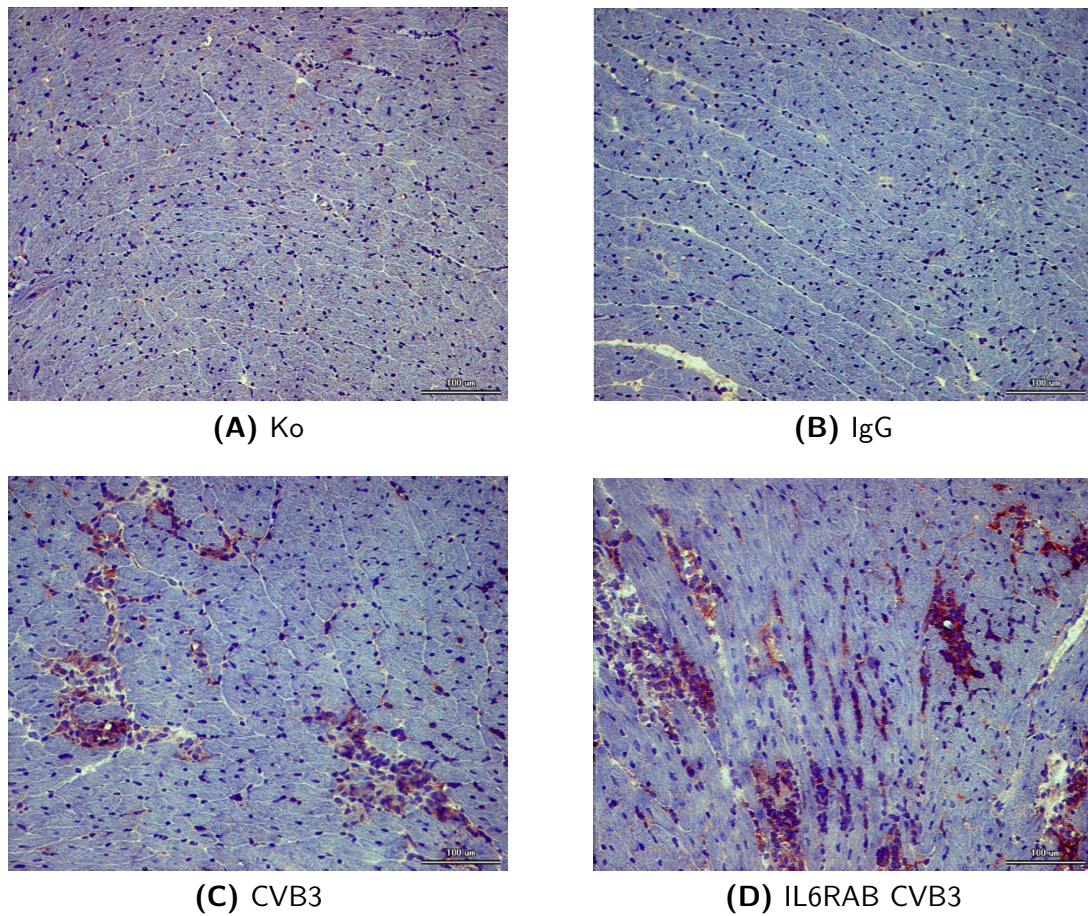
Für die T-Zellen allgemein wurde CD3, als eine Komponente des TCR, gefärbt. Sowohl in der Gruppe Ko als auch IgG, konnte kein nennenswertes Infiltrat gefunden werden. Die Gruppe CVB3 wies im Gegensatz hierzu ein signifikant erhöhtes Vorkommen an T-Zellen auf. Die Gruppe IL6RAB CVB3 wies ebenfalls eine Infiltration mit T-Zellen auf, jedoch signifikant reduziert (6-fach; $P = 0,0002$) im Vergleich zur Gruppe CVB3 (Abbildung 12). Die Population der CD8⁺-Zellen zeigte im Vergleich zu den CD3⁺-Zellen ein gegensätzliches Bild. In den Gruppen Ko und IgG konnte auch im Hinblick auf die CD8⁺-Zellen kein wesentliches Vorkommen verzeichnet werden. Die Gruppe CVB3 wies eine signifikante Steigerung an CD8⁺-Zellen im Vergleich zu den beiden erstgenannten Gruppen auf. Im Vergleich zwischen den Gruppen CVB3 und IL6RAB CVB3 zeigte sich jedoch eine 1,8-fache Steigerung ($P = 0,035$) an CD8⁺-Zellen in der Gruppe IL6RAB CVB3 (Abbildung 13). Die Färbung der CD68⁺ zeigte in den Gruppen Ko und IgG keinen Unterschied und nur ein geringes Vorkommen. Die Gruppe CVB3 wies in Abgrenzung hierzu ein deutlich gesteigertes Infiltrat auf (Abbildung 14), welches in der Gruppe IL6RAB CVB3 1,7-fach reduziert war ($P = 0,036$). Zur Quantifizierung des Anteils an B-Zellen im kardialen Infiltrat wurde CD80 als Oberflächenantigen aktivierter B-Zellen gefärbt. Die CD80⁺-Zellen in den Gruppen Ko und IgG sind kurz über der Nachweisgrenze, ein Unterschied zwischen den Gruppen konnte nicht festgestellt werden. Die Gruppe CVB3 weist sieben Tage nach Infektion einen deutlichen Anteil von aktivierten B-Zellen im kardialen Infiltrat auf. Die Gruppe IL6RAB CVB3 zeigt eine signifikante Reduktion (2,6-fach, $P = 0,0002$) der CD80⁺-Zellen verglichen mit der Gruppe CVB3 (Abbildung 15).

Insgesamt findet sich ein sehr geringes Vorkommen von Immunezellen in den Gruppen Ko und IgG. Ein deutlich gesteigertes Infiltrat mit Immunezellen weist die Gruppe CVB3 verglichen mit der nicht infizierten Gruppe Ko auf. Es wurden weniger T-Zellen Makrophagen und aktivierte B-Zellen im kardialen Gewebe der Gruppe IL6RAB CVB3 im Vergleich zu CVB3 detektiert. Allerdings sind mehr CD8⁺-Zellen im Gewebe der behandelten Gruppe IL6RAB CVB3 im Vergleich zur unbehandelten Gruppe CVB3 zu finden.



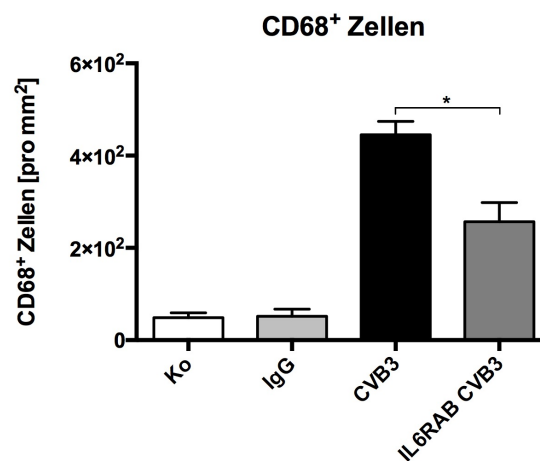
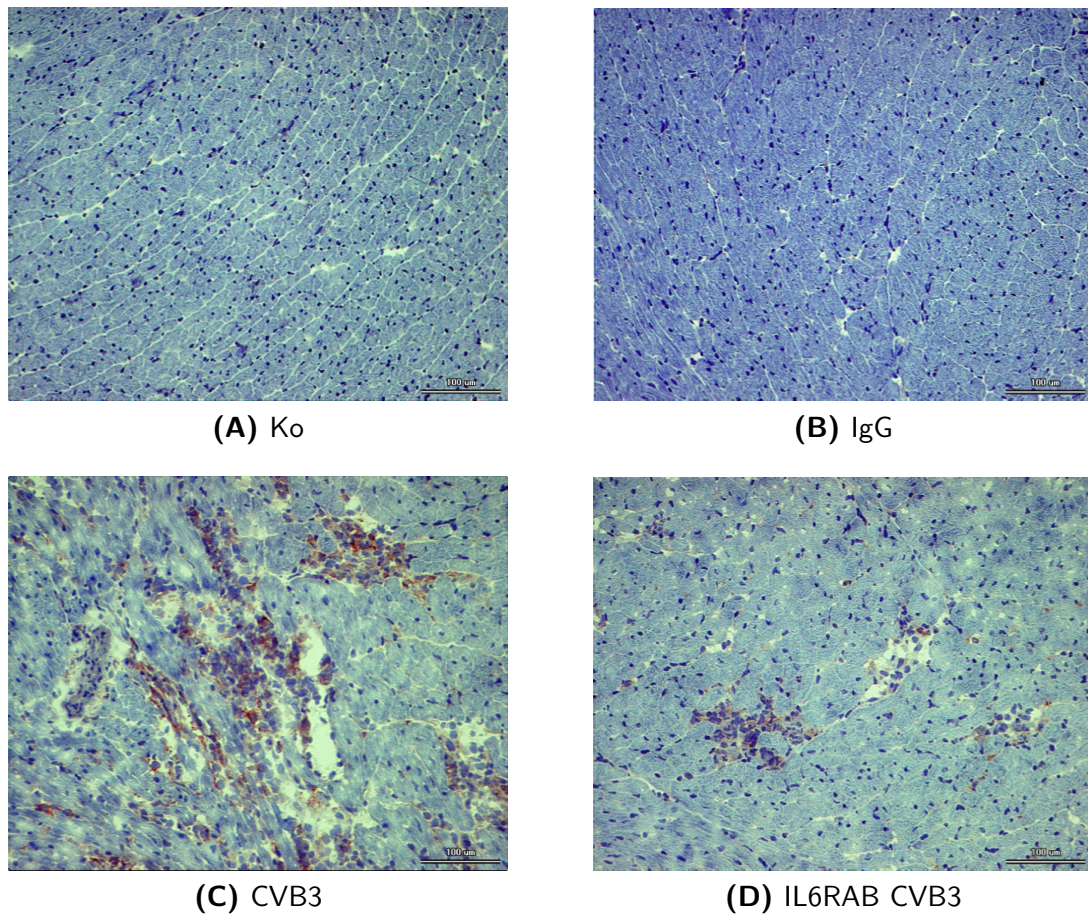
(E) Ergebnis der digitalen farbkodierten Bildanalyse

Abbildung 12 – **Färbung CD3⁺-Zellen** Repräsentative immunhistologische Bilder der Färbung CD3⁺-Zellen in kardialen Präparaten der Maus, sieben Tage nach CVB3 Infektion bei 200-facher lichtmikroskopischer Vergrößerung (A-D). Ergänzend dargestellt ist das Ergebnis der digitalen farbkodierten Bildanalyse der Färbung (E). Pro Tier wurden 3 Schnitte mit jeweils 20 Gesichtsfeldern pro Schnitt analysiert. Signifikanz (*) wurde für $P < 0,05$ angenommen. Alle Daten sind als $MW \pm SEM$ angegeben.



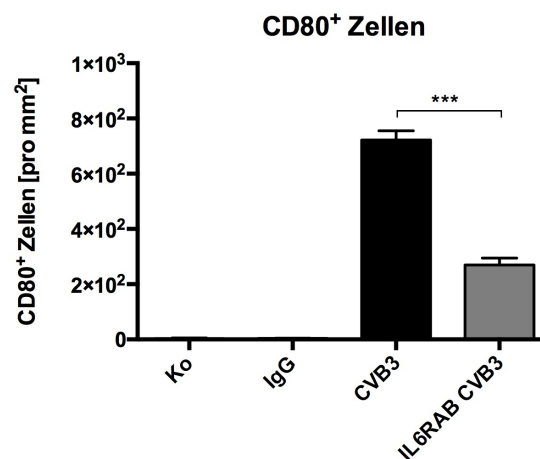
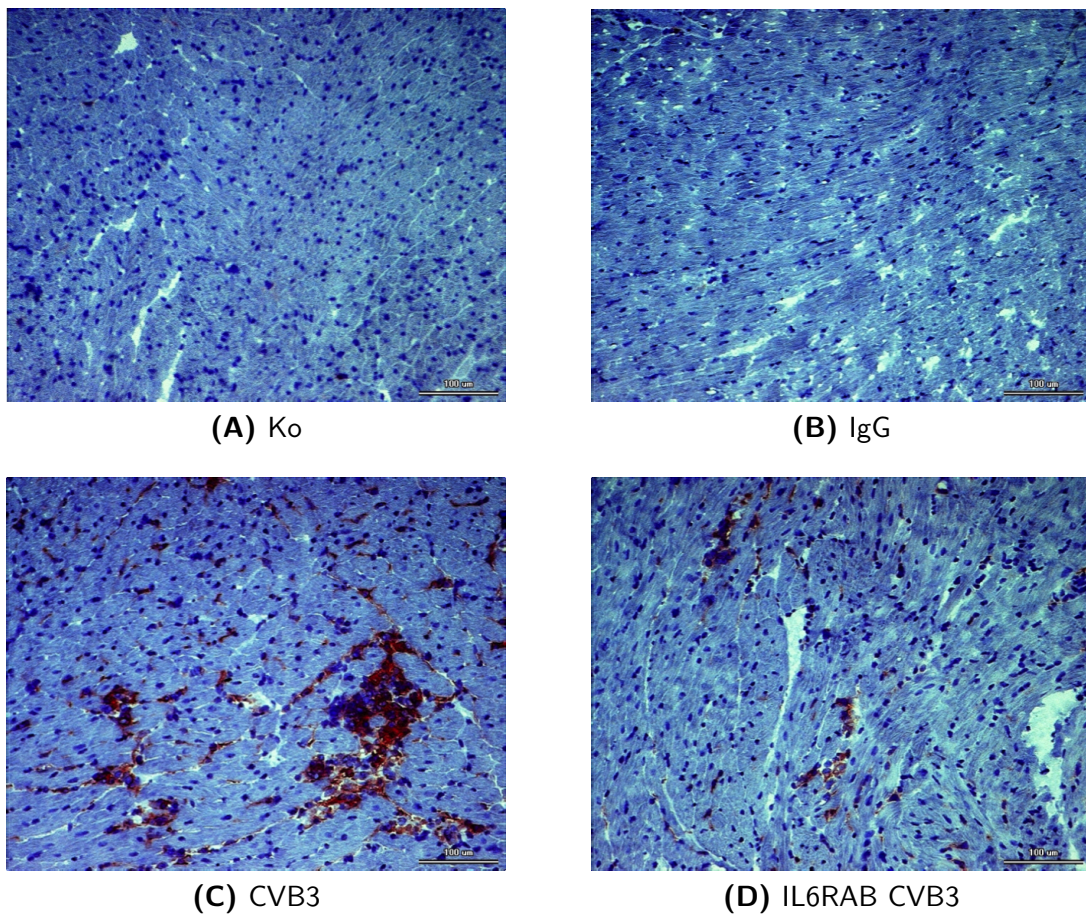
(E) Ergebnis der digitalen farbkodierten Bildanalyse

Abbildung 13 – **Färbung CD8⁺-Zellen** Repräsentative immunhistologische Bilder der Färbung CD8⁺-Zellen in kardialen Präparaten der Maus, sieben Tage nach CVB3 Infektion bei 200-facher lichtmikroskopischer Vergrößerung (A-D). Ergänzend dargestellt ist das Ergebnis der digitalen farbkodierten Bildanalyse der Färbung (E). Pro Tier wurden 3 Schnitte mit jeweils 20 Gesichtsfeldern pro Schnitt analysiert. Signifikanz (*) wurde für $P < 0,05$ angenommen. Alle Daten sind als $MW \pm SEM$ angegeben.



(E) Ergebnis der digitalen farbkodierten Bildanalyse

Abbildung 14 – **Färbung CD68⁺-Zellen** Repräsentative immunhistologische Bilder der Färbung CD68⁺-Zellen in kardialen Präparaten der Maus, sieben Tage nach CVB3 Infektion bei 200-facher lichtmikroskopischer Vergrößerung (A-D). Ergänzend dargestellt ist das Ergebnis der digitalen farbkodierten Bildanalyse der Färbung (E). Pro Tier wurden 3 Schnitte mit jeweils 20 Gesichtsfeldern pro Schnitt analysiert. Signifikanz (*) wurde für $P < 0,05$ angenommen. Alle Daten sind als $MW \pm SEM$ angegeben.



(E) Ergebnis der digitalen farbkodierten Bildanalyse

Abbildung 15 – **Färbung CD80⁺-Zellen** Repräsentative immunhistologische Bilder der Färbung CD80⁺-Zellen in kardialen Präparaten der Maus, sieben Tage nach CVB3 Infektion bei 200-facher lichtmikroskopischer Vergrößerung (A-D). Ergänzend dargestellt ist das Ergebnis der digitalen farbkodierten Bildanalyse der Färbung (E). Pro Tier wurden 3 Schnitte mit jeweils 20 Gesichtsfeldern pro Schnitt analysiert. Signifikanz (*) wurde für $P < 0,05$ angenommen. Alle Daten sind als $MW \pm SEM$ angegeben.

4.3.4 Frühe T-Zell Aktivierung

Zur Analyse der frühen T-Zell Reaktion wurden mRNA Expressionsdaten von ROR γ t, IL-23 Rezeptor, T-bet und IFN- γ mittels TaqMan[®] PCR 3 und 7 Tage nach Infektion erhoben (Abbildung 16). Für den T_H17-spezifischen Transkriptionsfaktor ROR γ t konnte nach 3 Tagen eine signifikante Hochregulation in der Gruppe CVB3 im Vergleich zu Ko verzeichnet werden. Dieser Anstieg war um das 3-fache höher als in der Gruppe IL6RAB CVB3 ($P = 0,001$). Zum 7-Tages-Zeitpunkt konnte dieser Unterschied nicht beobachtet werden (Abbildung 16 A). Beim IL-23 Rezeptor zeigte sich ebenfalls eine Hochregulation in den Gruppen CVB3 und IL6RAB CVB3 zum ersten Zeitpunkt. In der Gruppe CVB3 war dieser um das 1,7-fache im Vergleich zu IL6RAB CVB3 erhöht ($P = 0,026$). Dieser Unterschied war zum 7-Tages-Zeitpunkt nur noch als Tendenz ($P = 0,06$) erkennbar. Die Parameter zur T_H1 Differenzierung T-bet und IFN- γ wiesen zu beiden Zeitpunkten keine Unterschiede auf.

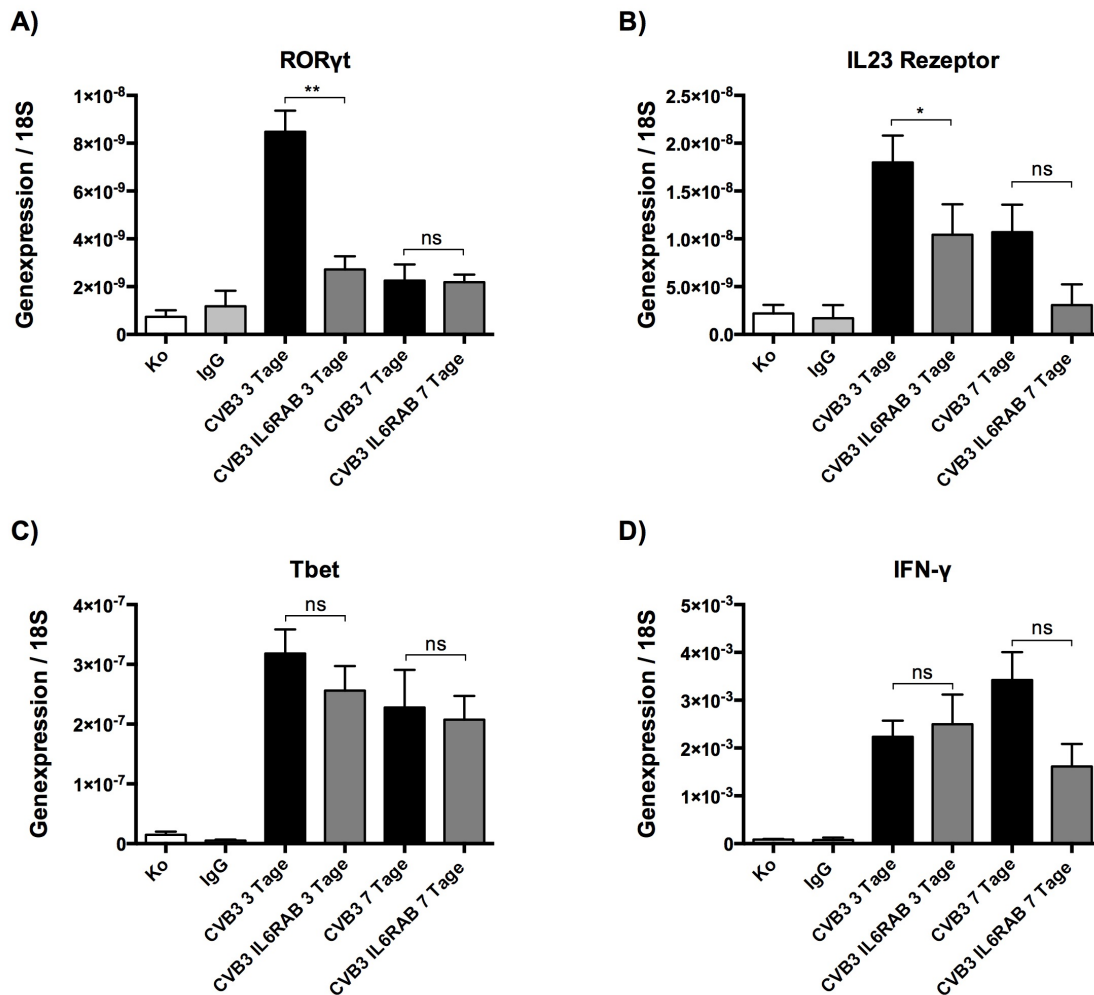


Abbildung 16 – **Frühe T-Zell Reaktion** Dargestellt ist die T_H1- bzw. T_H17-Reaktion in kardialen Gewebeproben. Für die T_H17 Differenzierung ist der Transkriptionsfaktor RORγt (A) sowie der IL-23 Rezeptor (B) dargestellt, welche beide von T_H17 Zellen exprimiert werden. Für die T_H1 Differenzierung wurden der Transkriptionsfaktor Tbet (C) sowie IFN-γ (D) als Schlüsselzytokin analysiert. Die Werte wurden zur Expression von 18S ins Verhältnis gesetzt. Alle Datensätze basieren auf 6 Werten pro untersuchter Probe und wurden als MW ± SEM ausgewiesen. * = P < 0,05; ** = P < 0,01; *** = P < 0,001; ns = nicht signifikant

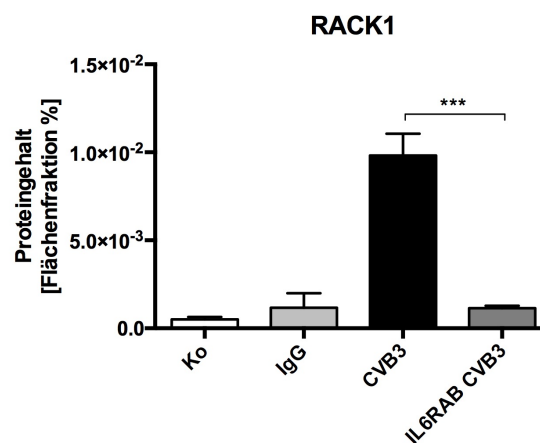
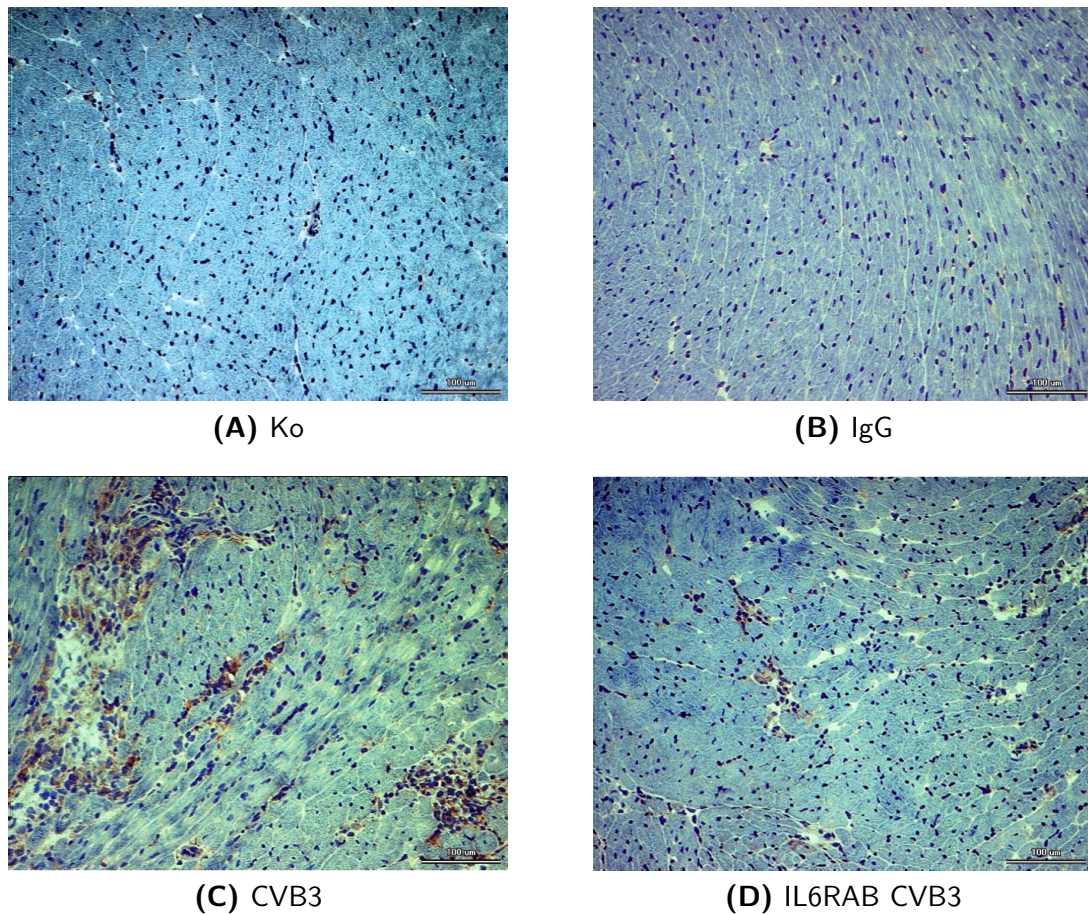
4.4 Kardiale Apoptose

Für die Darstellung der Apoptose nach viraler Myokarditis und der Auswirkungen einer IL-6 Rezeptorblockade in diesem Zusammenhang, wurden die Anzahl apoptotischer Zellen (TUNEL⁺-Zellen) und die Initiation der Apoptose durch pro-apoptotische Zytokine (RACK1) untersucht. Die Gruppen Ko und IgG zeigten in beiden Versuchen ein niedriges Vorkommen gleichen Ausmaßes. Nach Infektion mit CVB3 konnte sowohl für RACK1 als auch für TUNEL ein signifikanter Anstieg in der Gruppe CVB3 verzeichnet werden. In der Gruppe IL6RAB fand sich für RACK1 eine 8,5-fache Reduktion ($P = 0,0003$) und für TUNEL eine 1,8-fache Reduktion ($P = 0,0286$) im Vergleich zu CVB3 (Abbildung 17 und 18).

4.5 Kardiales Remodeling

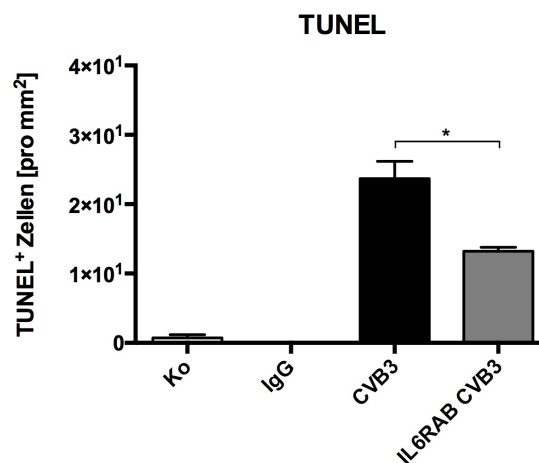
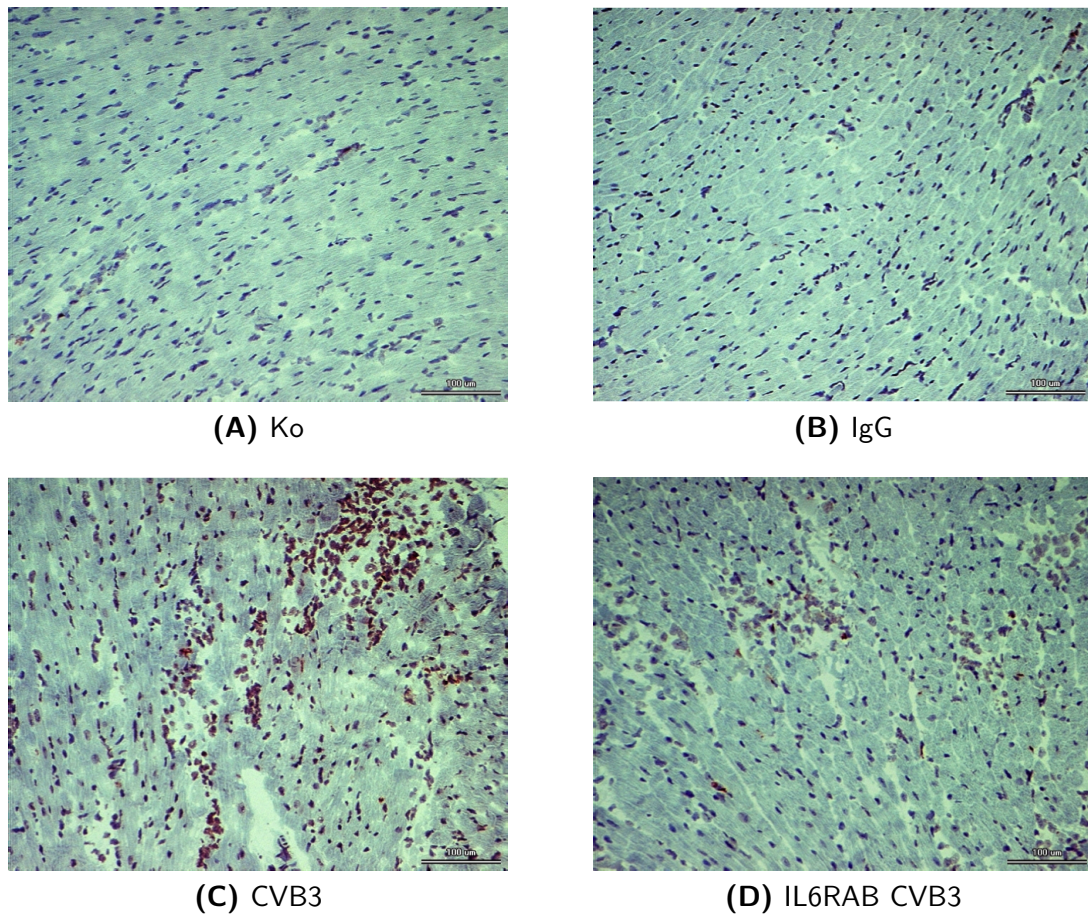
Da das kardiale Remodeling immer mehr an Bedeutung für das Outcome der Patienten nach einer Myokarditis gewinnt, wurde das Vorkommen diverser Faktoren, die diesen Prozess nachweislich beeinflussen, auf Proteinebene näher untersucht. Neben α -Smooth muscle actin (α -SMA) als Bestandteil des Myofibroblasten wurden Kollagen I und III sowie die MMPs 2 und 9 mittels immunhistologischer Färbung im kardialen Gewebe detektiert.

Für α -SMA zeigte sich in den Gruppen Ko und IgG ein geringes bzw. nicht nachweisbares Vorkommen. Die Gruppe CVB3 hingegen wies einen 19-fachen Anstieg ($P = 0,0002$) von α -SMA im Vergleich zu den beiden ersten Gruppen auf. Im Vergleich zwischen der Gruppe CVB3 und IL6RAB CVB3 zeigte sich ein 5,9-facher Abfall ($P = 0,0002$) in der Gruppe IL6RAB CVB3 (Abbildung 19). Abbildung 20 zeigt die Ergebnisse der Färbung von Kollagen I. Hier findet sich bei den Gruppen Ko und IgG eine normal niedrige Expression. Die Expression in der Gruppe CVB3 ist um den Faktor 10 erhöht ($P = 0,0002$). In der behandelten Gruppe IL6RAB CVB3 findet sich im Vergleich hierzu ein 6,2-facher Abfall ($P = 0,0002$). Auch Kollagen III wird in den ersten beiden Gruppen gleichmäßig exprimiert und zeigt eine 1,6-fach höhere Expression ($P = 0,0485$) nach CVB3-Infektion. Diese wird jedoch in der Gruppe IL6RAB CVB3 nicht registriert. Diese ist im Vergleich zu CVB3 1,9-fach ($P = 0,0203$) reduziert (Abbildung 21). Die MMP-Expression wird als verlässlicher Marker für das Ausmaß des überschießenden kardialen Remodelings nach Infektion geführt. Besonders die Gelatinasen MMP-2 und MMP-9 sind in diesem Zusammenhang von Bedeutung. Für beide MMPs konnten wir ein deutliches vermehrtes Vorkommen nach CVB3 Infektion in der Gruppe CVB3 detektieren. Für MMP-2 machte dies einen Anstieg auf das 70-Fache ($P = 0,0006$) aus, für MMP-9 einen Anstieg auf das 10-Fache ($P = 0,0571$) verglichen mit der zugehörigen Kontrolle. In der Gruppe IL6RAB CVB3 war im Vergleich zur Gruppe CVB3 die mRNA Expression für MMP-2 6-fach ($P = 0,0003$) reduziert. Für MMP-9 zeigte sich ebenfalls eine Reduktion, diese war jedoch nicht signifikant (Abbildung 22 und 23).



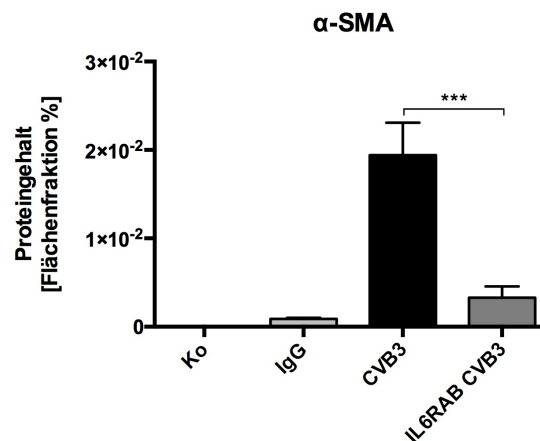
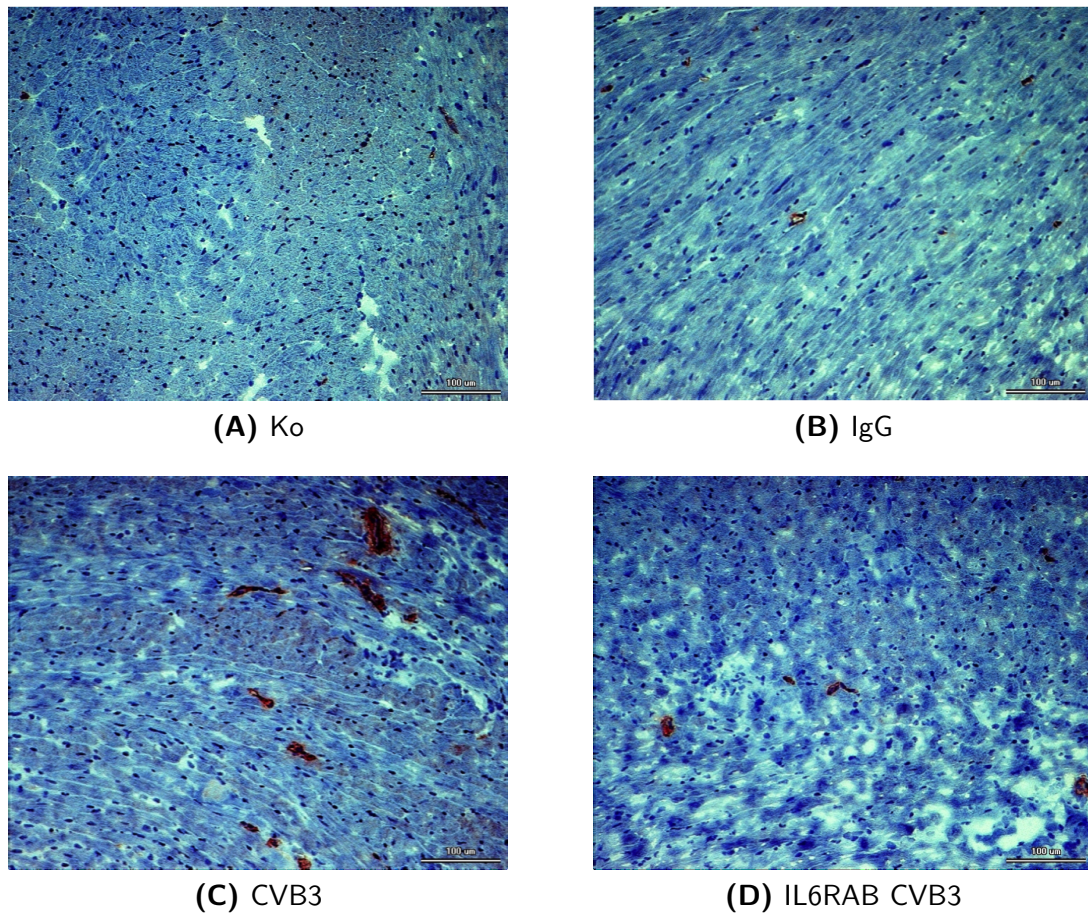
(E) Ergebnis der digitalen farbkodierten Bildanalyse

Abbildung 17 – **Färbung RACK** Repräsentative immunhistologische Bilder der Färbung von RACK in kardialen Präparaten der Maus, sieben Tage nach CVB3 Infektion bei 200-facher lichtmikroskopischer Vergrößerung (A-D). Ergänzend dargestellt ist das Ergebnis der digitalen farbkodierten Bildanalyse der Färbung (E). Pro Tier wurden 3 Schnitte mit jeweils 20 Gesichtsfeldern pro Schnitt analysiert. Signifikanz (*) wurde für $P < 0,05$ angenommen. Alle Daten sind als $MW \pm SEM$ angegeben.



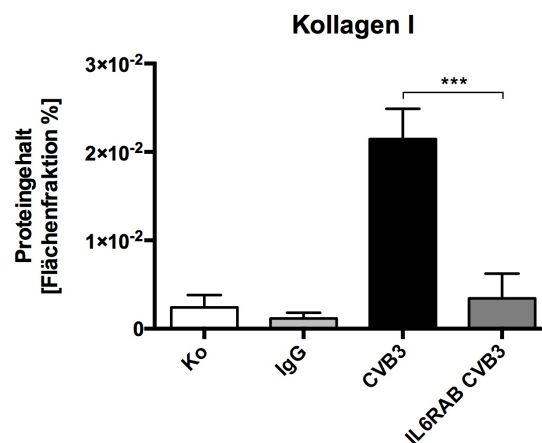
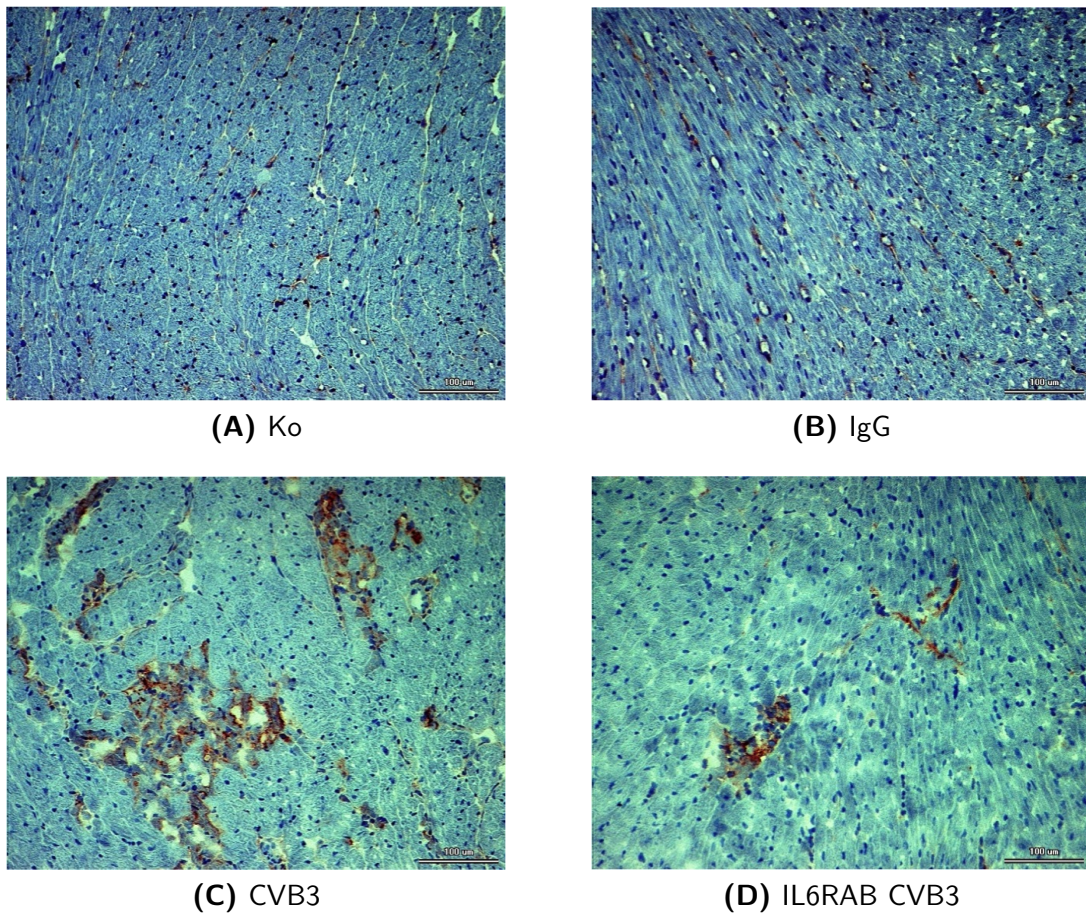
(E) Ergebnis der digitalen farbkodierten Bildanalyse

Abbildung 18 – **Färbung TUNEL** Repräsentative immunhistologische Bilder der Färbung TUNEL⁺-Zellen in kardialen Präparaten der Maus, sieben Tage nach CVB3 Infektion bei 200-facher lichtmikroskopischer Vergrößerung (A-D). Ergänzend dargestellt ist das Ergebnis der digitalen farbkodierten Bildanalyse der Färbung (E). Pro Tier wurden 3 Schnitte mit jeweils 20 Gesichtsfeldern pro Schnitt analysiert. Signifikanz (*) wurde für $P < 0,05$ angenommen. Alle Daten sind als $MW \pm SEM$ angegeben.



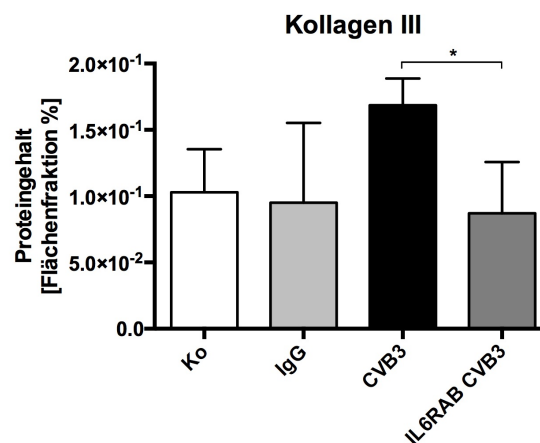
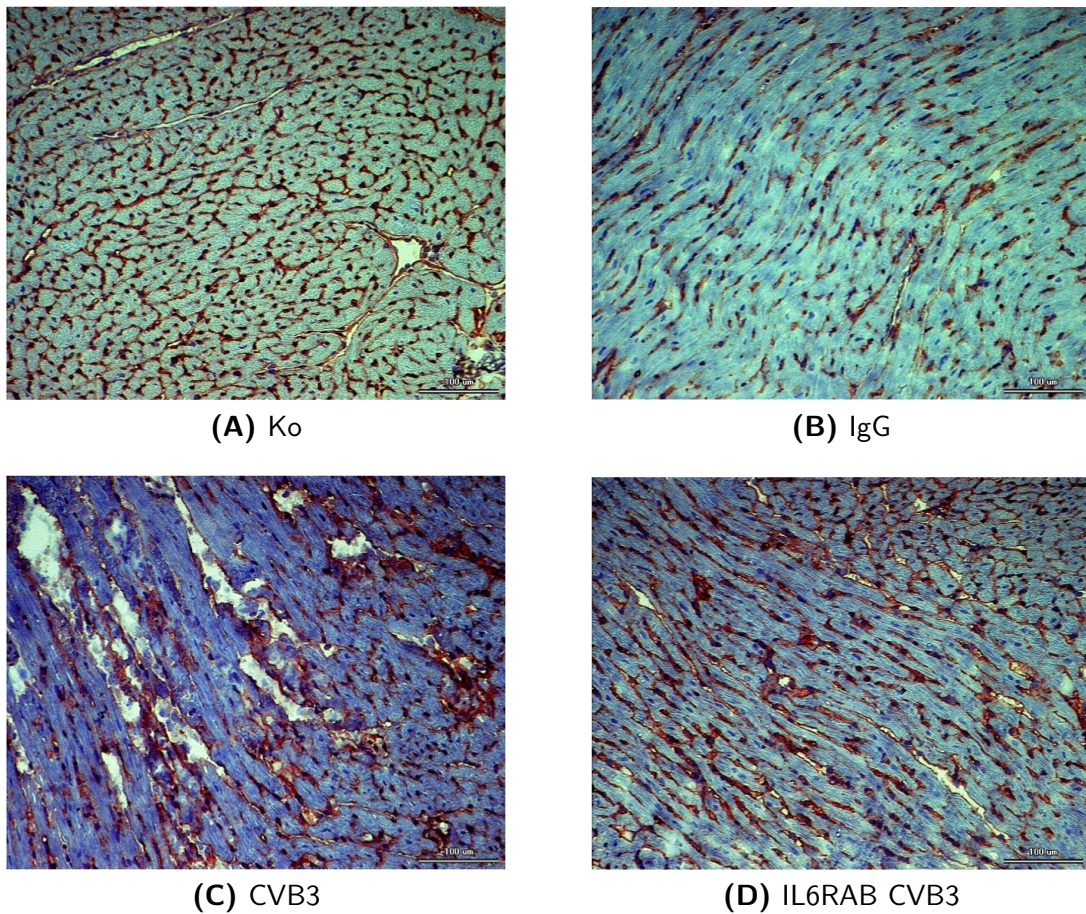
(E) Ergebnis der digitalen farbkodierten Bildanalyse

Abbildung 19 – **Färbung α-SMA** Repräsentative immunhistologische Bilder der Färbung von α-SMA in kardialen Präparaten der Maus, sieben Tage nach CVB3 Infektion bei 200-facher lichtmikroskopischer Vergrößerung (A-D). Ergänzend dargestellt ist das Ergebnis der digitalen farbkodierten Bildanalyse der Färbung (E). Pro Tier wurden 3 Schnitte mit jeweils 20 Gesichtsfeldern pro Schnitt analysiert. Signifikanz (*) wurde für $P < 0,05$ angenommen. Alle Daten sind als $MW \pm SEM$ angegeben.



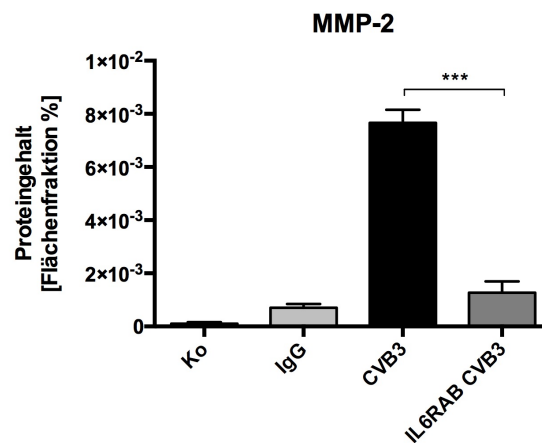
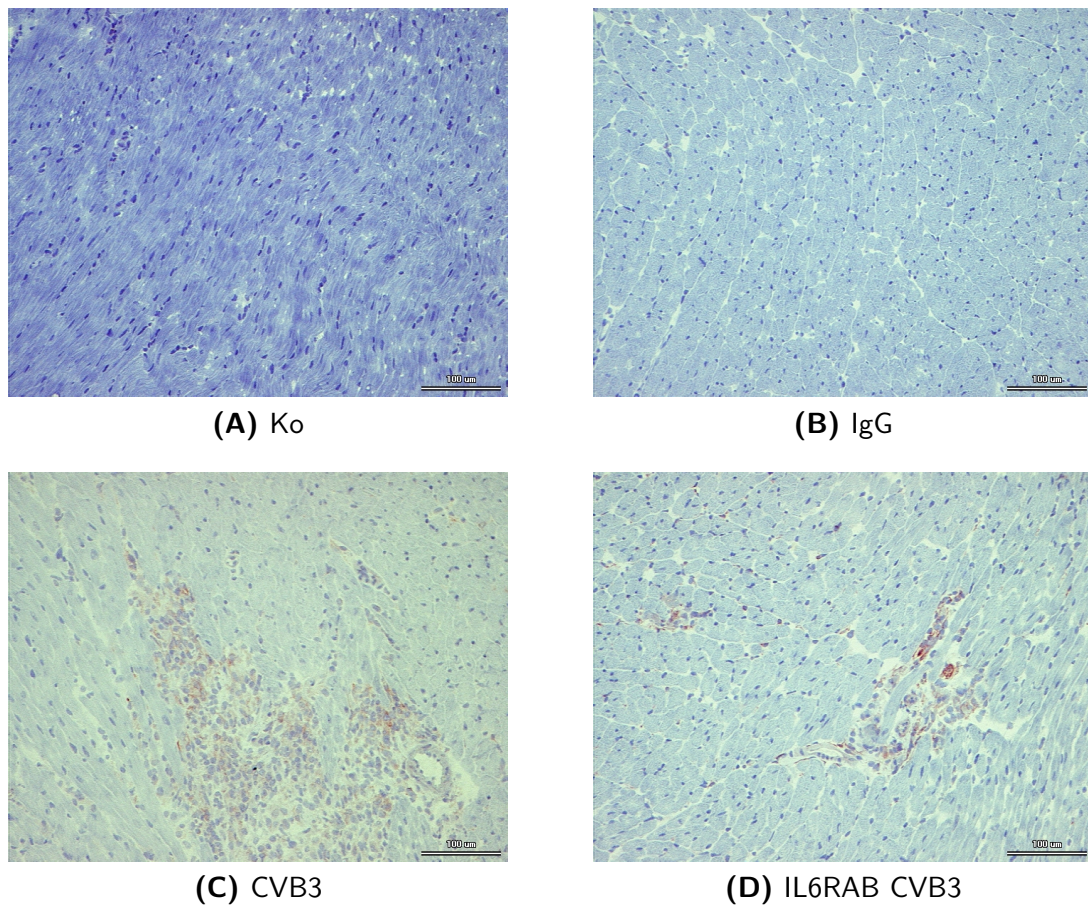
(E) Ergebnis der digitalen farbkodierten Bildanalyse

Abbildung 20 – **Färbung Kollagen I** Repräsentative immunhistologische Bilder der Färbung von Kollagen I in kardialen Präparaten der Maus, sieben Tage nach CVB3 Infektion bei 200-facher lichtmikroskopischer Vergrößerung (A-D). Ergänzend dargestellt ist das Ergebnis der digitalen farbkodierten Bildanalyse der Färbung (E). Pro Tier wurden 3 Schnitte mit jeweils 20 Gesichtsfeldern pro Schnitt analysiert. Signifikanz (*) wurde für $P < 0,05$ angenommen. Alle Daten sind als $MW \pm SEM$ angegeben.



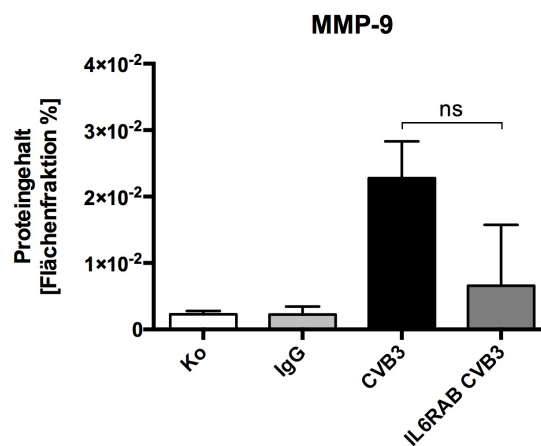
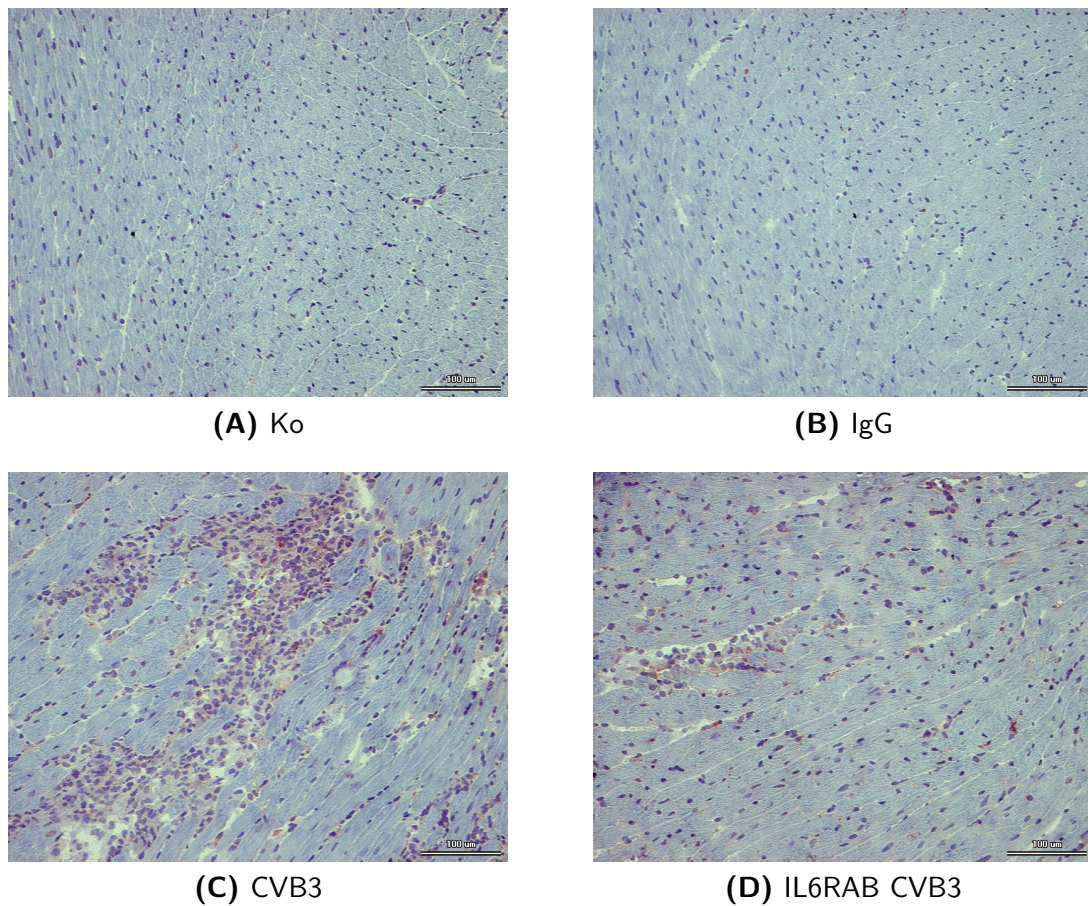
(E) Ergebnis der digitalen farbkodierten Bildanalyse

Abbildung 21 – **Färbung Kollagen III** Repräsentative immunhistologische Bilder der Färbung von Kollagen III in kardialen Präparaten der Maus, sieben Tage nach CVB3 Infektion bei 200-facher lichtmikroskopischer Vergrößerung (A-D). Ergänzend dargestellt ist das Ergebnis der digitalen farbkodierten Bildanalyse der Färbung (E). Pro Tier wurden 3 Schnitte mit jeweils 20 Gesichtsfeldern pro Schnitt analysiert. Signifikanz (*) wurde für $P < 0,05$ angenommen. Alle Daten sind als $MW \pm SEM$ angegeben.



(E) Ergebnis der digitalen farbkodierten Bildanalyse

Abbildung 22 – **Färbung MMP-2** Repräsentative immunhistologische Bilder der Färbung von MMP-2 in kardialen Präparaten der Maus, sieben Tage nach CVB3 Infektion bei 200-facher lichtmikroskopischer Vergrößerung (A-D). Ergänzend dargestellt ist das Ergebnis der digitalen farbkodierten Bildanalyse der Färbung (E). Pro Tier wurden 3 Schnitte mit jeweils 20 Gesichtsfeldern pro Schnitt analysiert. Signifikanz (*) wurde für $P < 0,05$ angenommen. Alle Daten sind als $MW \pm SEM$ angegeben.



(E) Ergebnis der digitalen farbkodierten Bildanalyse

Abbildung 23 – **Färbung MMP-9** Repräsentative immunhistologische Bilder der Färbung von MMP-9 in kardialen Präparaten der Maus, sieben Tage nach CVB3 Infektion bei 200-facher lichtmikroskopischer Vergrößerung (A-D). Ergänzend dargestellt ist das Ergebnis der digitalen farbkodierten Bildanalyse der Färbung (E). Pro Tier wurden 3 Schnitte mit jeweils 20 Gesichtsfeldern pro Schnitt analysiert. Signifikanz (*) wurde für $P < 0,05$ angenommen. Alle Daten sind als $MW \pm SEM$ angegeben.

4.6 Hämodynamische Funktion

Sieben Tage nach viraler Infektion mit CVB3, wurden alle Tiere einer hämodynamischen Konduktanzkatheter-Messung in finaler Narkose zugeführt. Die infizierten Tiere (CVB3 und IL6RAB CVB3) wiesen eine signifikante Verschlechterung der kardialen Funktion gegenüber den Kontrolltieren (Ko und IgG) auf (Tabelle 17).

4.6.1 Globale Herzfunktion

In der Gruppe CVB3 zeigte sich im Vergleich zu Ko deutliche Einbußen in nahezu allen Parametern der globalen Herzfunktion. Lediglich die Herzfrequenz (HR) wies keine signifikanten Unterschiede nach der Infektion auf. Der maximale systolische Druck (P_{\max}) war in der Gruppe CVB3 deutlich reduziert im Vergleich zu Ko. Diese Reduktion konnte sich in der Gruppe IL6RAB nicht finden. Zwar lag auch hier ein Unterschied zur Gruppe IgG vor, dieser war jedoch nicht signifikant. Der Unterschied zwischen den Gruppen CVB3 und IL6RAB CVB3 bezogen auf P_{\max} war nicht signifikant. Bei Schlagvolumen (SV), Schlagarbeit (SW), Herzzeitvolumen (CO) und Ejektionsfraktion (EF) fanden sich signifikante Reduktionen der bei den infizierten Gruppen (CVB3 und IL6RAB CVB3) in Relation zur jeweiligen Kontrolle (Ko bzw. IgG). Im Vergleich der Gruppen CVB3 und IL6RAB CVB3 konnten darüber hinaus Anstiege in der Gruppe IL6RAB CVB3 im Vergleich zu CVB3 ausgemacht werden. Diese stellten sich wie folgt dar: SV 1,3-fach ($P = 0,0008$), SW 1,5-fach ($P = 0,0111$), CO 1,3-fach ($P = 0,0182$) und EF 1,5-fach ($P = 0,0009$).

4.6.2 Systolische Herzfunktion

Ein ähnliches Bild fand sich in Bezug auf die Parameter der systolischen Funktion. Das LVESV wies eine signifikante Steigerung in der Gruppe CVB3 verglichen mit der Gruppe Ko auf, welche in der Gruppe IL6RAB CVB3 nicht zu verzeichnen war. Der Unterschied zwischen den Gruppen CVB3 und IL6RAB CVB3 bezogen auf das LVESV zeigte eine 1,2-fache Reduktion ($P = 0,0286$) in der Gruppe IL6RAB CVB3. Im Hinblick auf die Werte für dP/dt_{\max} und LVESP wurden signifikante Reduktionen in den Gruppen CVB3 und IL6RAB CVB3 zu den jeweiligen Kontrollen gemessen. In der Gruppe IL6RAB CVB3 fanden sich zudem Anstiege bezogen auf dP/dt_{\max} 1,2-fach ($P = 0,0423$) und LVESP 1,2-fach ($P = 0,0432$) in Relation zu CVB3.

4.6.3 Diastolische Herzfunktion

Die Evaluation der diastolischen Funktion zeigte ebenfalls starke Einbußen der kardialen Funktion. Bezogen auf das LVEDV stellten sich diese als Reduktion, bezogen auf die Werte für LVEDP, dP/dt_{\min} , τ , PHT und β als Steigerung in den Gruppen CVB3 und IL6RAB CVB3 im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle dar. Der Unterschied zwischen den Gruppen

Tabelle 17 – **Hämodynamische Parameter** Alle Werte wurden *in vivo* mittels eines 1,2 french Mikrokonduktanzkatheters in Form von PV-Kurven sieben Tage nach CVB3-Infektion gemessen ($n = 10$ Tiere pro Versuchsgruppe). Alle Daten wurden als MW \pm SEM ausgewiesen. # = $P < 0,05$ vs. Ko, † = $P < 0,05$ vs. IgG, * = $P < 0,05$ vs. CVB3.

Messgröße	Einheit	Ko	IgG	CVB3	IL6RAB CVB3
Globale Herzfunktion					
HR	Schläge/min	548 \pm 17	533 \pm 20	486 \pm 30	489 \pm 14
P _{max}	mmHg	71.4 \pm 2.8	67.6 \pm 2.9	54.8 \pm 4.2 [#]	58.2 \pm 5.1
SV	µl	24.5 \pm 4.5	23.8 \pm 0.7	13.5 \pm 0.6 [#]	18 \pm 0.9 ^{†*}
SW	µl×mmHg	2567 \pm 304	2491 \pm 278	964 \pm 138 [#]	1445 \pm 95 ^{†*}
CO	ml/min	19.2 \pm 2.6	18.9 \pm 1.4	5.9 \pm 0.6 [#]	7.8 \pm 0.4 ^{†*}
EF	%	72 \pm 5.5	73 \pm 3.7	43 \pm 4.1 [#]	63 \pm 2.6 ^{†*}
Systolische Herzfunktion					
LVESV	µl	12 \pm 0.8	11 \pm 1.1	16 \pm 1.3 [#]	13 \pm 0.7 [*]
dP/dt _{max}	mmHg/s	7509 \pm 484	7302 \pm 472	4325 \pm 892 [#]	5268 \pm 533 ^{†*}
LVE SP	mmHg	71.2 \pm 1.8	68.6 \pm 3.3	50.3 \pm 4.5 [#]	59.6 \pm 4.2 ^{†*}
Diastolische Herzfunktion					
LVEDV	µl	33 \pm 1.9	34 \pm 1.4	25 \pm 1.8 [#]	27 \pm 1.2 [†]
LVEDP	mmHg/s	2.3 \pm 0.3	2.5 \pm 0.4	7.1 \pm 0.6 [#]	3.5 \pm 0.4 [*]
dP/dt _{min}	mmHg/s	-4788 \pm 265	-4405 \pm 257	-1906 \pm 262 [#]	-3010 \pm 218 ^{†*}
τ	ms	10.21 \pm 0.5	10.6 \pm 0.5	17.7 \pm 1.3 [#]	12.9 \pm 0.8 ^{†*}
PHT	ms	5.5 \pm 0.3	5.7 \pm 0.3	13.7 \pm 1.8 [#]	7.5 \pm 0.5 ^{†*}
β	mmHg/µl	0.04 \pm 0.002	0.05 \pm 0.003	0.11 \pm 0.004 [#]	0.07 \pm 0.004 ^{†*}

CVB3 und IL6RAB CVB3 für das LVEDV kann nicht als signifikant angesehen werden. Die Werte für die restlichen Parameter der diastolischen Funktion unterschieden sich zwischen den infizierten Gruppen wie folgt: LVEDP 2-fach ($P = 0,0001$) dP/dt_{min} 1,6-fach ($P = 0,00047$) τ 1,4-fach ($P = 0,00067$) PHT 1,8-fach ($P = 0,00074$) und β 1,6-fach ($P = 0,0001$).

4.7 Versuche in Zellkultur

Zur genaueren Analyse der Auswirkungen einer CVB3-Infektion auf einzelne kardiale Zellen wurden Versuche in Zellkultur durchgeführt. Von besonderem Interesse war in diesem Zusammenhang die Zytokinexpression von IL-6 und TNF- α nach Infektion mit CVB3 und nach Stimulation mit IL-6. Kardiale Fibroblasten (FB), Kardiomyozyten (HL-1) und Monozyten (RAW-Zelllinie) wurden in Kultur mit CVB3 infiziert und im Anschluss auf die virale Kopienzahl bzw. die Expression von IL-6 mRNA und TNF- α mRNA mittels TaqMan[®] PCR untersucht nach 6 und 24 Stunden untersucht. Der gleiche Versuch wurde als Stimulationsversuch mit 10 ng IL-6 durchgeführt.

4.7.1 Expression von IL-6 und TNF- α nach CVB3-Infektion in vitro

Nach Infektion mit CVB3 zeigten sich zunächst deutliche Unterschiede in der Kopienzahl des Virus unter den Zellen. Es stellte sich eine deutliche Infektion der Fibroblasten heraus. Bezogen auf die Kopienzahl waren sie gefolgt von den Kardiomyozyten. Die Makrophagen wiesen im Vergleich der drei Zelllinien die geringste Kopienzahl auf. Ein hoch signifikanter Anstieg ($P < 0,0001$) nach 24 h stellte sich bei Fibroblasten (400-fach) und Kardiomyozyten (94-fach) dar. Die Makrophagen zeigten hingegen eine 2,4-fache Reduktion ($P < 0,0001$) der Kopienzahl (Abbildung 24).

In der Beobachtung der Zytokinexpression nach Infektion zeigte sich bei den Kardiomyozyten zum initialen Zeitpunkt kein wesentlicher Unterschied für IL-6 zwischen infizierten Zellen und den Kontrollen. Nach 24 h stellte sich jedoch ein 1,6-facher Anstieg ($P = 0,0051$) bei den infizierten Zellen ein. TNF- α war zu keinem Zeitpunkt in der Kultur der Kardiomyozyten nachweisbar (Abbildung 25 A). Die Fibroblasten wiesen nach 6 h keinen Unterschied in der Produktion von IL-6 und TNF- α auf. Dies entwickelte sich nach 24 h zu einem 3,6-fachen Anstieg ($P < 0,0001$) für IL-6 und einem 17,2-fachen Anstieg ($P = 0,0002$) für TNF- α bei den infizierten Zellen (Abbildung 25 B). Die Makrophagen, zeigten nach 6 Stunden eine 1,4-fach gesteigerte Produktion ($P = 0,0099$) von TNF- α die sich nach 24 Stunden als 1,3-fache Reduktion ($P < 0,0001$) darstellte. Bei ihnen war IL-6 nicht nachweisbar (Abbildung 25 C). Insgesamt lässt sich sagen, dass die Ausschüttung von IL-6 und TNF- α der Fibroblasten durch eine Infektion mit CVB3 deutlich verstärkt wird. Kardiomyozyten produzieren IL-6, was sich durch Infektion ebenfalls steigert, jedoch zu keinem Zeitpunkt TNF- α . Makrophagen produzieren kein IL-6, wohl aber eine gesteigerte Menge TNF- α in der initialen Phase der Infektion, was sich im Verlauf abmildert (Abbildung 25).

4.7.2 Expression von IL-6 und TNF- α nach Stimulation mit IL-6 in vitro

Zusätzlich zu den Infektionsversuchen, wurde die Expression von IL-6 und TNF- α nach Stimulation mit 10 ng IL-6 ebenfalls bei Fibroblasten, HL-1 Kardiomyozyten und Makrophagen untersucht. Bei den Kardiomyozyten konnte ein 1,5-facher Anstieg ($P = 0,0003$) der IL-6 mR-

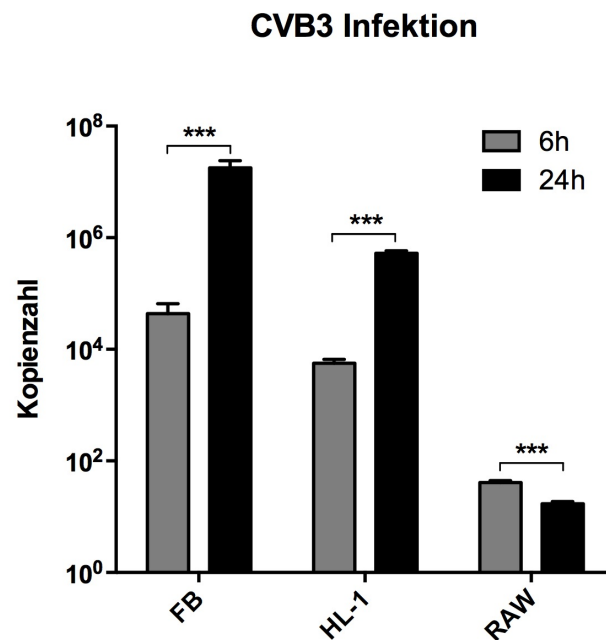


Abbildung 24 – **CVB3-Infektion bei Fibroblasten, Kardiomyozyten und Monozyten** Bei der isolierten Infektion von Fibroblasten (FB), Kardiomyozyten (HL1) und Monozyten (RAW) in der Zellkultur zeigt sich die höchste Viruslast in den Fibroblasten sowohl nach 6 als auch nach 24 Stunden Inkubation. Am wenigsten befallen waren die Monozyten zu beiden Zeitpunkten. Alle Datensätze basieren auf 6 Werten pro Gruppe und wurden als MW \pm SEM ausgewiesen. *** = $P < 0,001$

NA Expression nach 6 Stunden verzeichnet werden. Nach 24 Stunden fand sich ein erneuter Anstieg, dieser kann jedoch nicht als signifikant betrachtet werden. TNF- α war, wie schon bei dem Infektionsversuch, in der Kultur der Kardiomyozyten nicht nachweisbar (Abbildung 26 A). Die Fibroblasten wiesen nach 6 Stunden keine wesentliche Steigerung in der IL-6 mRNA Expression auf. Nach 24 Stunden fand sich dann ein 3,4-facher Anstieg ($P = 0,0011$). Für TNF- α konnte ein ähnliches Bild beobachtet werden. Nach 6 Stunden war es zu keiner signifikanten Änderung der mRNA-Expression in der Kultur der Fibroblasten gekommen. Nach 24 Stunden konnte ein 2,2-facher Anstieg ($P = 0,0188$) verglichen mit der Kontrolle verzeichnet werden (Abbildung 26 B). Bei den Makrophagen war, wie schon im Infektionsversuch keine Expression von IL-6 nachzuweisen. Für TNF- α zeigte sich ein 1,3-facher Anstieg ($P = 0,0008$) nach 6 Stunden und ein Abfall nach 24 Stunden, welcher jedoch keine Signifikanz aufwies (Abbildung 26 C).

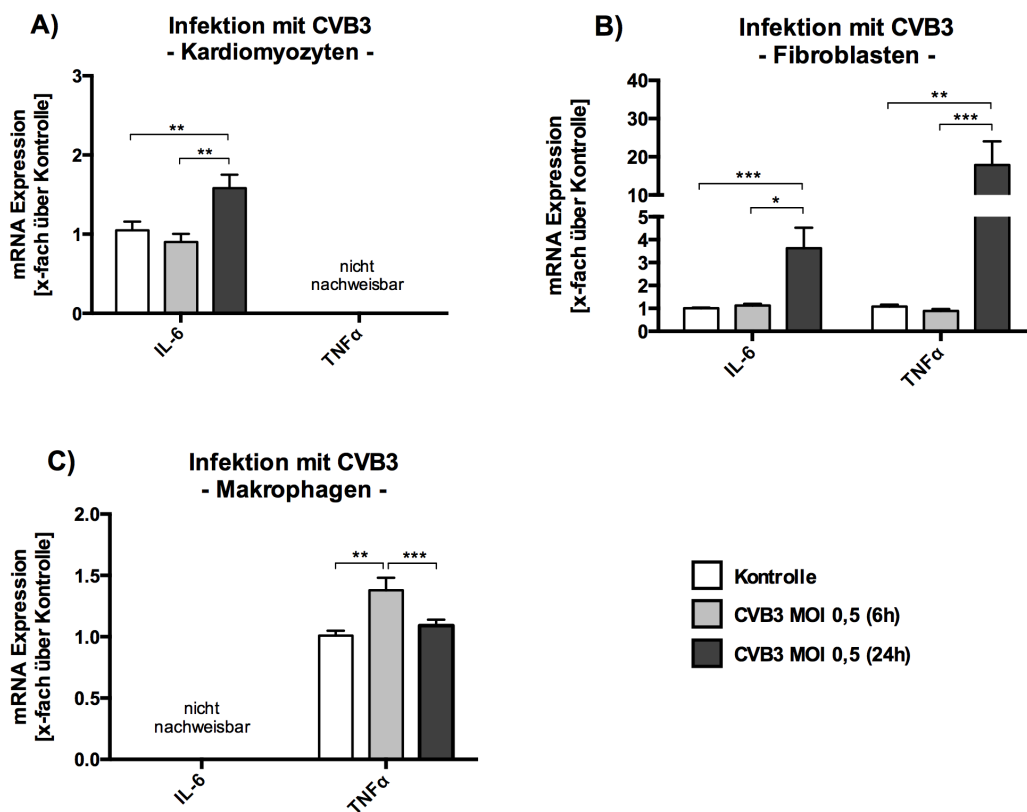


Abbildung 25 – **Zytokinexpression nach CVB3-Infektion** Dargestellt ist die Expression von IL-6 und TNF- α durch Fibroblasten, Kardiomyozyten und Makrophagen 6 und 24 Stunden nach CVB3-Infektion. Alle Datensätze basieren auf 6 Werten pro Gruppe und wurden als $MW \pm SEM$ ausgewiesen. * = $P < 0,05$; ** = $P < 0,01$; *** = $P < 0,001$

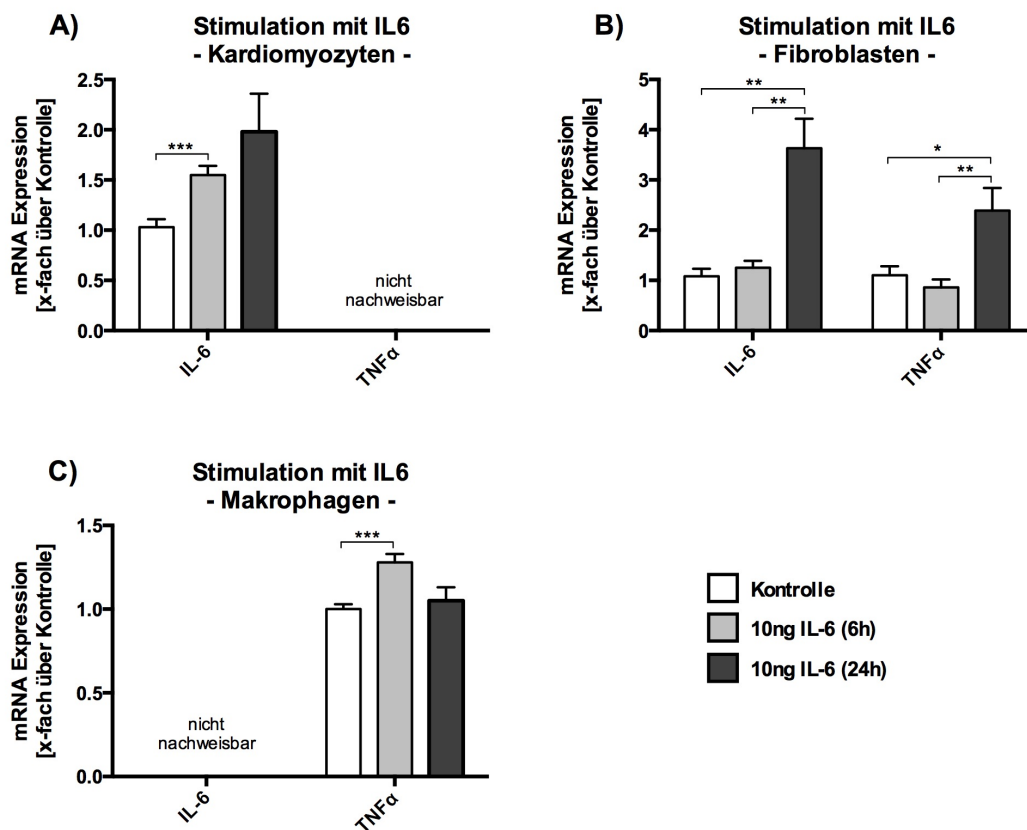


Abbildung 26 – **Zytokinexpression nach Stimulation mit 10 ng IL-6** Dargestellt ist die Expression von IL-6 und TNF- α durch Fibroblasten, Kardiomyozyten und Makrophagen 6 und 24 Stunden nach Stimulation mit 10 ng IL-6. Alle Datensätze basieren auf 6 Werten pro Gruppe und wurden als MW \pm SEM ausgewiesen. * = P < 0,05; ** = P < 0,01; *** = P < 0,001

5 Diskussion

Myokarditis ist ein komplexes Krankheitsbild, dem ein multifaktorielles Krankheitsgeschehen zugrunde liegt. Die Bedeutung immunologischer Prozesse im Rahmen des Krankheitsverlaufs ist in diversen Arbeiten dargestellt worden [11, 61, 99]. Zwar bestehen nach wie vor Fragen bezüglich der genauen Pathogenese der Myokarditis, doch zielgerichtete immunmodulatorische Therapien werden für die Entwicklung eines kausalen Therapiekonzeptes immer bedeutsamer. In der vorliegenden Arbeit wird der Einfluss der IL-6-Rezeptorblockade auf die Inflammation der viralen Myokarditis im murinen Tiermodell untersucht. Hierbei konnte gezeigt werden, dass sich diese Intervention protektiv auf den Verlauf der Erkrankung auswirkt. Durch die Blockade des IL-6-Rezeptors mit dem Antikörper MR16-1 kam es zu einer deutlich reduzierten Krankheitsausprägung bei den behandelten Tieren. Dies zeigte sich in verminderter Inflammation, Apoptose und reduziertem kardialen Remodeling. Es konnte darüber hinaus eine deutliche Verbesserung der kardialen Funktion nach induzierter Myokarditis festgestellt werden. Im Folgenden sollen die Ergebnisse der vorliegenden Studie in Bezug auf die aktuelle Literatur diskutiert werden.

5.1 Schweregrad der viralen Myokarditis

Die Erhebung des Körpergewichts der Tiere, wie auch das isolierte Gewicht des linken Ventrikels und des Lungengewebes (feucht und trocken), sind ein verlässliches Maß für das allgemeine Befinden und die Progredienz der Erkrankung der Tiere. Kranke Tiere nehmen weniger Futter zu sich und befinden sich durch die Erkrankung allgemein in einer katabolen Stoffwechsellage. Sie verlieren somit an Gewicht [191]. Andererseits lagern die Tiere, die unter einer Herzinsuffizienz infolge einer myokardialen Schädigung leiden, Wasser ein - es kommt in Folge eines Linksherzversagens zu einem Rückstau des Blutes in die Lunge und somit zum kardialen Lungenödem. In der vorliegenden Studie kam es zu einem signifikanten Gewichtsverlust sowohl bei den Körper- und LV-Gewichten in beiden infizierten Gruppen, als Zeichen einer erfolgreichen Infektion. Zu einem signifikanten Anstieg des Lungenfeuchtgewichts kam es in der Gruppe CVB3. Dieser unterschied sich signifikant von der Gruppe IL6RAB CVB3. Hier zeigt sich ein deutliches Ödem in der Gruppe CVB3, welches bei den Tieren der Gruppe IL6RAB CVB3 nicht zu verzeichnen ist. Die getrockneten Lungen wiesen im Mittel keinen Gewichtsunterschied auf, was zeigt, dass das Lungengewebe in Bezug auf das Volumen - auch unter Infektion - unverändert geblieben ist. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Werten der hämodynamischen Funktionsmessung, die ebenfalls eine deutliche Verbesserung der linksventrikulären Funktion bei der behandelten Gruppe zeigte. Es ist davon auszugehen, dass das Lungenödem in der Gruppe CVB3 Folge einer akuten Herzinsuffizienz im Rahmen der viralen Myokarditis ist. Das Ausbleiben dieses Ödems bestätigt die Hypothese, dass die Blockade des IL-6 Rezeptors im Fall der viralen Myokarditis protektiv wirkt.

Die Einordnung der HE-gefärbten Myokardschnitte in den Myokarditis-Score erlaubt einen Überblick über die Ausprägung der kardialen Inflammation. Das Ausmaß der Immunzellinfiltration, Zellnekrose und Narbenbildung gehen in die Bewertung für den Myokarditis-Score ein. Vermehrte Inflammation und ein ausgeprägtes zelluläres Infiltrat gehen mit deutlichen Einbußen der kardialen Funktion einher [192]. Hier konnte gezeigt werden, dass die Gruppe CVB3 eine Myokarditis mit entsprechend deutlichem Infiltrat entwickelt hat. Die Gruppe IL6RAB CVB3 wies im Vergleich zur Gruppe CVB3 ein signifikant geringeres zelluläres Infiltrat auf. Dies bestätigt die Hypothese, dass die Blockade von IL-6 eine Reduktion der myokardialen Inflammation zur Folge hat. Die Übersichtsfärbung zeigt bei den Gruppen Ko und IgG keine Inflammation, was zu erwarten war.

5.2 Myokardiale Inflammation

Der Ablauf und die Regulationsmechanismen der Inflammation sind der zentrale Schlüssel zum Verständnis der Myokarditis. Die Pathogenese vom Eintritt des Virus bis zum überschießenden kardialen Remodeling stellt unzählige Stellschrauben dar. Sowohl das Zytokinprofil, welches die Interaktion verschiedener Zellpopulationen untereinander bestimmt, als auch die Aktivierung und Infiltration von Immunzellen selbst, sind wichtige Elemente auf diesem Weg. Anhand der erhobenen Daten sollen einige Schlüsselpositionen der Immunreaktion dargestellt werden.

5.2.1 Zytokinexpression im myokardialen Gewebe

Die zelluläre Interaktion durch Zytokine nimmt eine wesentliche Rolle im Ablauf des inflammatorischen Prozesses ein. Die Bedeutung dieser vermittelnden Substanzen im Hinblick auf die Pathogenese der Myokarditis ist bereits in mehreren Arbeiten gezeigt worden [61, 193, 194]. Auch in dieser Studie ist davon auszugehen, dass die Resultate, die sich auf zellulärer Ebene zeigten, maßgeblich durch den Eingriff in das gesamte Zytokinnetzwerk, durch die Blockade des IL-6 Rezeptors, bestimmt sind.

Für die Ausprägung der kardialen Inflammation bei der viralen Myokarditis ist die Regulation proinflammatorischer Zytokine (TNF- α und IL-1 β) ein Schlüsselmechanismus [195]. Eine TNF- α -Defizienz verhindert die Entwicklung einer Myokarditis. Die Applikation von TNF- α hebt diesen Mechanismus wieder auf [196]. TNF- α spielt sowohl bei der Unterhaltung der Inflammation der akuten Myokarditis, wie auch bei der Entwicklung einer DCM eine entscheidende Rolle [197, 198]. IL-1 β ist gemeinsam mit IL-6 für die Induktion der Akutphase-Reaktion wichtig und nimmt in der Pathologie diverser inflammatorischer Erkrankungen eine entscheidende Rolle ein [199]. Darüber hinaus führt IL-1 β zu einer vermehrten Freisetzung von IL-6 [200]. Die IL-6 Rezeptorblockade führt zu einer deutlichen Reduktion der mRNA Expression von TNF- α und IL-1 β . Hieraus resultiert, dass die Intervention für den milderen Verlauf der Inflammation in der Gruppe IL6RAB CVB3 im Vergleich zur Gruppe CVB3

verantwortlich ist. Darüber hinaus konnte kein signifikanter Unterschied in der Expression von CCL-2, IL-10, IFN- β und TGF- β festgestellt werden. Die Expression dieser Zytokine scheint durch die IL-6 Rezeptorblockade unbeeinflusst.

5.2.2 Regulation von Adhäsionsmolekülen

Die Regulation von Adhäsionsmolekülen, hier beispielhaft anhand von Interzelluläres Zelladhäsionsmolekül (ICAM) untersucht, ist ein wichtiger Schritt zur Migration von Leukozyten in das infizierte Areal. ICAM wird auf der Oberfläche von Endothelzellen exprimiert und bindet an heterodimere Proteine der Integrin-Proteinfamilie, welche auf der Oberfläche der Leukozyten exprimiert werden [201]. Die Regulation dieser Adhäsionsmoleküle ist ein relevantes Glied in der Ausprägung der Myokarditis. Sie wird durch Zytokine, maßgeblich IL-1 β , IL-4 und TNF- α initiiert und begünstigt im Besonderen die Transmigration von T-Zellen [202]. In der vorliegenden Studie zeigt sich eine signifikante Steigerung der ICAM-Regulation in der Gruppe CVB3, verglichen mit der Gruppe IL6RAB CVB3. Dies könnte Ursache dafür sein, dass in der Gruppe CVB3 ein deutlich gesteigertes zelluläres Infiltrat auffällt. Es ist jedoch zu bemerken, dass die stimulierenden Faktoren von ICAM, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden (IL-1 β und TNF- α), ebenfalls durch die IL-6 Blockade runterreguliert sind. Eine kausale Aussage zur Regulation von ICAM ist daher schwierig. Wie zuvor beschrieben, ist der Einfluss der Intervention im Bereich der zytokingesteuerten Immunmodulation zu sehen. Der Einfluss auf die Expression von ICAM könnte somit als Resultat dessen gesehen werden.

5.2.3 Immunzellinfiltration

Zur Quantifizierung und Differenzierung der zellulären Abwehrreaktion wurden spezifische Oberflächenantigene mittels immunhistochemischer Methoden gefärbt. Zur allgemeinen Darstellung des Anteils an T-Zellen im kardialen Infiltrat wurde CD3 als Teil des TCR genutzt, welcher auf aktivierten T-Zellen exprimiert wird. In Abgrenzung hierzu wurde CD8 als Marker der CD8⁺-Zellen-Zellen untersucht. CD68 fand als Makrophagenantigen Anwendung und CD80 klassifiziert aktivierte B-Zellen.

Die Rolle der T-Zellen für die Pathogenese der viralen Myokarditis ist bereits mehrfach beschrieben worden [14, 81, 82, 83]. Vor allem für die frühe antivirale Abwehr sind sie essentiell [83]. In der vorliegenden Studie wurde untersucht, in wie weit sich die Blockade von IL-6 auf das Vorkommen von T-Zellen allgemein und auf die Ausdifferenzierung im Besonderen auswirkt. Es zeigte sich eine deutliche Reduktion aktivierter T-Zellen in der Gruppe IL6RAB CVB3 im Vergleich zur Gruppe CVB3. Diese Daten decken sich mit der Aussage, dass die Proliferation von T-Zellen durch IL-6 vermittelt wird [76]. Eine Blockade des Zytokins hatte somit die Reduktion der Gesamtzahl an T-Zellen zur Folge. Weiterhin ist die selektive Stimulation von CD8⁺-Zellen durch IL-6 beschrieben [203]. Dies kann durch die vor-

liegenden Daten für die virale Myokarditis bestätigt werden. Die Tiere der Gruppe IL6RAB CVB3 wiesen eine deutliche Zunahme der CD8⁺-Zellen im Vergleich zu CVB3 auf. Dies kann im Rahmen der Viruselimination in der Frühphase der Infektion durchaus von Nutzen sein. Über welchen Mechanismus die Blockade von IL-6 zu diesem Anstieg von CD8⁺-Zellen führt, bleibt hingegen unklar. Möglich wäre, dass IL-6 im Rahmen der CD8⁺-Zellen-Entwicklung eine hemmende Funktion hat, welche durch die Blockade aufgehoben wird. Dies kann jedoch durch die Literatur nicht bestätigt werden. Eher ist gegenteilig belegt, dass IL-6 in der Entwicklung zu CD8⁺-Zellen aus naiven T-Zellen gemeinsam mit IL-1 eine verstärkende Wirkung hat [204]. Diese Erkenntnis kann jedoch nicht uneingeschränkt gelten, da auch die Effekte von IL-6 auf T-Zellen als durchaus heterogen beschrieben sind und insbesondere von den Empfängerzellen abhängen [205].

Sowohl die Makrophagen, als auch die B-Zellen wiesen eine deutliche Reduktion in der Gruppe IL6RAB CVB3 im Vergleich zu CVB3 auf. Der Name BSF-2, den IL-6 vor seiner Klassifizierung als Interleukin hatte [122], belegt die stimulierende Wirkung auf B-Zellen, welche sich in diesem Versuch durch Blockade im Ergebnis als Reduktion wiederfindet. Auch in Bezug auf die Induktion von Makrophagen wurde IL-6 schon früh als stimulierender Signalstoff beschrieben [133]. In Übereinstimmung hierzu führt die Blockade von IL-6 auch im Rahmen der Myokarditis zu einer Reduktion dieser Zellreihe im kardialen Infiltrat (Abbildung 14). Es ist belegt, dass ein ausgeprägtes Infiltrat in Kombination mit Viruspersistenz und gesteigerter kardialer Inflammation im Rahmen der Myokarditis mit kompromittierter Pumpfunktion und schlechter Prognose einhergeht [23, 206]. Dies konnte in unserer Studie ebenfalls gezeigt werden. Die Gruppe IL6RAB CVB3 wies, verglichen mit der Gruppe CVB3, neben einem reduzierten Immunzellinfiltrat eine deutlich verbesserte Pumpfunktion auf.

5.2.4 Frühe T-Zell Aktivierung

IL-6 begünstigt die Differenzierung von CD4⁺-Zellen zu T_H17 und hat wegen dieser Eigenschaft eine wichtige Position in der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen und inflammatorischen Erkrankungen allgemein [74, 207, 208]. Der Aktivierung von T_H17 Zellen kommt eine Schlüsselfunktion im Rahmen der viralen Myokarditis in Bezug auf Viruselimination und der Entwicklung einer DCM zu [209, 12, 210]. Es wurde bereits gezeigt, dass die IL-6 Rezeptorblockade, die Aktivierung von T_H17-Zellen bei der rheumatoiden Arthritis reduzieren kann [211]. Die Analyse der Transkriptionsfaktoren und essentiellen Zytokine der T_H1 und T_H17 Antwort nach 3 Tagen zeigt eine normale T_H1-Reaktion bei den behandelten Tieren (IL6RAB CVB3). Diese scheint von der Blockade des IL-6 Rezeptors unbeeinflusst. Es fand sich jedoch eine deutlich eingedämmte T_H17-Reaktion in der Gruppe IL6RAB CVB3 im Vergleich zu CVB3, was sich in einer reduzierten mRNA-Expression für ROR γ t und dem IL-23 Rezeptor niederschlägt. Die verminderte Expression des IL-23 Rezeptors, welcher vornehmlich auf T_H17-Zellen exprimiert wird, konnte auch nach 7 Tagen noch beobachtet werden. Diese Daten lassen vermuten, dass den T_H17-Zellen eine wichtige Rolle in der Pathologie der

viralen Myokarditis zukommt, diese jedoch in der frühen Phase der Krankheitsentwicklung zu verorten ist.

5.2.5 Effekte von IL-6 auf kardiale Zellen

Zur Analyse der lokalen Effekte von IL-6 im Myokard wurde die IL-6-Expression immunhistochemisch im gesunden Tier und nach Infektion dargestellt. Hier zeigte sich ein deutlicher Anstieg von IL-6 in der Gruppe CVB3. Dies deckt sich mit der Aussage, dass IL-6 in die Ausprägung der Inflammation und die Rekrutierung von Immunzellen involviert ist [212]. Um die Zytokinsekretion einzelner kardialer Zellen genauer zu untersuchen, wurden zusätzlich Experimente in Zellkultur durchgeführt. Hierbei wurde die Expression von IL-6 und TNF- α durch einzelne kardiale Zellen ermittelt. Untersucht wurden Fibroblasten, Kardiomyozyten und Makrophagen. Alle drei Zelltypen haben im Krankheitsverlauf der Myokarditis und im Hinblick auf die Entwicklung einer kardialen Inflammation eine wichtige Rolle. Die Bedeutung der Fibroblasten wird in den letzten Jahren immer intensiver erforscht [213, 214, 215]. Es konnte gezeigt werden, dass Fibroblasten an der Rekrutierung von T_H17-Zellen im Rahmen der akuten Virusmyokarditis beteiligt sind [215]. IL-6 seinerseits hat auf Fibroblasten einen antiapoptotischen Effekt [216]. Makrophagen sind an der IL-6 Produktion nur indirekt beteiligt, indem sie Fibroblasten stimulieren IL-6 freizusetzen [217].

Die Veränderungen in der Expression für IL-6 und TNF- α nach Infektion mit CVB3 zeigt, dass der Fibroblast die Zelle ist, die als einzige beide Zytokine sezerniert. Dies wird sich durch eine Infektion mit CVB3 in erheblichem Maße gesteigert. Die Kardiomyozyten zeigen ebenfalls eine Expression von IL-6 sowie eine Steigerung der Freisetzung nach Infektion. Die Produktion von TNF- α konnte bei Kardiomyozyten nicht nachgewiesen werden. Makrophagen hingegen zeigen ein spiegelbildliches Verhalten: eine Freisetzung von IL-6 blieb zu beiden Zeitpunkten aus. TNF- α hingegen wurde in der Frühphase der Infektion in deutlich gesteigertem Ausmaß gegenüber den nichtinfizierten Zellen gemessen. Dies relativierte sich im Verlauf der Infektion. Aus dieser Darstellung wird klar, dass der Fibroblast für Expression beider Zytokine eine zentrale Funktion einnimmt. Dies kann als Schlüsselement zur Initiierung der Inflammation gewertet werden, da die gesteigerte Expression von IL-6 mit einem Anstieg von TNF- α assoziiert war.

Auch die Ergebnisse der Stimulationsveruche unterstreichen die Bedeutung Fibroblasten für das immunologische Geschehen der viralen Myokarditis. Es zeigt sich, dass eine Sekretion von IL-6 hauptsächlich von Kardiomyozyten und Fibroblasten ausgeht, jedoch nur bei den Fibroblasten im Sinne einer positiven Verstärkung reguliert zu sein scheint. Zwar konnte auch bei Kardiomyozyten eine gewisse Steigerung der Expression von IL-6 gemessen werden, jedoch in wesentlich geringerem Ausmaß. Der Nachweis einer direkten IL-6 Freisetzung von Makrophagen blieb aus. Diese steigerten hingegen ihre Expression von TNF- α , was sich im Rahmen der Myokarditis ebenfalls negativ auswirkt.

5.3 Kardiale Apoptose

Die Quantifizierung der Apoptose ist für die Pathogenese der viralen Myokarditis aufgrund verschiedener Aspekte sinnvoll. Zum Einen gibt eine höhere Apoptoserate indirekten Aufschluss über die Viruspersistenz, da die virale Infektion ein Weg für die Zelle in den programmierten Zelltod darstellt [48]. Es konnte gezeigt werden, dass das proapoptotische Protein, Apoptose induzierender Faktor (Siva), welches als Bindungspartner für das Virus Capsid VP2 fungiert, in der gleichen Region hochreguliert wird, in der auch die Apoptosemarker CD27 und CD70 stark exprimiert sind [218]. Durch Zerstörung und Zerfall dieser Zellen, werden nach Auflösung der Zytoplasmamembran Viren erneut freigesetzt und können nun umliegende noch gesunde Zellen befallen. Andererseits bedingen apoptotische Zellen und auch Zellen in der proapoptotischen Phase eine verstärkte Inflammation durch Freisetzung proinflammatorischer Zytokine [49]. Um die Rolle von IL-6 in Bezug auf die Apoptose differenziert zu untersuchen ist es wichtig zu erwähnen, dass ein erfolgreiches Signalling über gp130/STAT3 einen antiapoptotischen Effekt im Rahmen einer Virusinfektion von Kardiomyozyten aufweist [219].

Um das Ausmaß der Apoptose im Rahmen unseres Versuchs zu objektivieren, färbten wir die kardialen Gewebsschnitte mit der Dead EndTM Colorimetric TUNEL Methode, welche für den Nachweis apoptotischer Zellen geeignet ist. Hierbei werden nukleäre DNA-Fragmente, als wichtiger biochemischer Marker für Apoptose quantifizierbar gemacht. Ein weiterer Marker zu Klassifizierung der Apoptose ist der Rezeptor für aktivierte Proteinkinase C (RACK1), ein Protein welches in der Induktion von Apoptose an mehreren Stellen wirken kann. Ein zentraler Aspekt dieses Proteins ist jedoch die Funktion im Rahmen der T-Zell-Apoptose, welche hier von besonderem Interesse ist [220].

Beide Marker zeichnen ein eindeutiges Bild, welches mit den anderen Ergebnissen keineswegs in Widerspruch steht. Die Apoptose in der Versuchsgruppe IL6RAB CVB3 war im Vergleich zur Gruppe CVB3 fast bis auf das Maß der Kontrollen reduziert. Dies spricht dafür, dass sowohl die Apoptose, die durch direkte Virusinteraktion entstanden ist, als auch Aktivierung durch apoptotische Zytokine, in einen fatalen Kreislauf münden: durch das zugrunde gehen der Kardiomyozyten in Folge einer Infektion mit dem Virus, werden Entzündungszellen an den Ort des Geschehens gelockt. Diese zerstören zum Teil infizierte Zellen und tragen so zur Verbreitung der viralen RNA bei.

Von besonderem Interesse wäre in Zusammenhang mit der durchgeführten Intervention eine Auswirkung auf die Apoptoseinduktion über eine Modulation des gp130/STAT3-Signalweges gewesen. Diesem kommt, wie oben erwähnt, eine Funktion im Schutz vor Apoptose zu. Eine direkte Rolle von IL-6 über diesen Mechanismus konnte in unserem Versuch jedoch nicht beobachtet werden. Wir mutmaßen daher, dass sich die Auswirkungen der IL-6 Blockade zu einem früheren Zeitpunkt der Immunreaktion zeigen und so vor dem Eintritt

in einen Teufelskreis, aus gesteigerter Apoptose und in Folge verstärkter Inflammation, bewahren.

5.4 Kardiales Remodeling

Das Maß des kardialen Remodelings ist schon in vielen Arbeiten als maßgeblicher Faktor für das Outcome von Patienten nach inflammatorischen Prozessen des Myokards nachgewiesen [104, 99, 98]. Auch in der vorliegenden Arbeit wurde dieser Aspekt der viralen Myokarditis untersucht. Anhand verschiedener Parameter, die in Zusammenhang mit verstärktem kardialen Remodling als maßgeblich erachtet werden, soll der Einfluss der IL-6 Blockade auch auf das kardiale Remodeling diskutiert werden. Neben den Parametern Kollagen I und Kollagen III, die als Reaktion auf Entzündung in unterschiedlichem Ausmaß gebildet werden, haben wir die Aktivität von MMP-2 und MMP-9 gemessen sowie α -SMA als Faktor für verstärkte Fibrose immunhistochemisch quantifiziert.

Auf Ebene der Kollagene zeigte sich eine deutliche Vermehrung beider Kollagenfraktionen in der Gruppe CVB3. Der Anstieg in der Gruppe IL6RAB CVB3 muss hingegen als moderat bezeichnet werden. Den Unterschied konnten wir als signifikant belegen. Auffällig ist jedoch, dass der Anstieg des Kollagen I wesentlich stärker ausfällt, als der des Kollagen III. Dies bedingt eine Verschiebung der Kollagen I/III Ratio zugunsten des Kollagen I. Zur Initiierung von Reparaturvorgängen der ECM, werden Fibroblasten aktiviert, welche dann zu α -SMA-produzierenden Myofibroblasten werden und neues Kollagen in vermehrten Ausmaß produzieren [221]. Da die Menge der Fibroblasten im Verhältnis der kardialen Zellen mit ca. 70% einen erheblichen Anteil ausmacht, ist die Bedeutung ihrer Aktivität für den Verlauf der Erkrankung entscheidend [112, 222]. Auch in anderen Organsystemen konnte schon gezeigt werden, dass ein übermäßiges Vorhandensein von Myofibroblasten zu überschießender Fibrose führt [223, 224]. Auch wir haben die Menge von α -SMA immunhistochemisch untersucht und in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Kollagenfärbung einen deutlichen Anstieg in der Gruppe CVB3 verglichen mit IL6RAB CVB3 gefunden. Dies führt uns zu der Annahme, dass die Aktivität der Fibroblasten durch die vorherrschende Inflammation verstärkt wird und in Folge zu einer Versteifung des linken Ventrikels führt. Die vorgelegten *in vivo*-Daten zur hämodynamischen Funktion unter IL-6 Rezeptorblockade unterstützen diese These. Sowohl in der Steifigkeitskonstante β , welche im Vergleich der Gruppen IL6RAB CVB3 und CVB3 bei der Gruppe CVB3 deutlich zunimmt, als auch das Gesamtbild der diastolischen Dysfunktion, welches sich bei den Tieren der Gruppe CVB3 darstellt, suggerieren eine deutliche Versteifung der Herzen in dieser Gruppe.

Als zweites Merkmal zur Bestimmung extrazellulärer Umbauvorgänge haben wir das Vorkommen der Gelatinasen MMP-2 und MMP-9 bestimmt, die einen wesentlichen Einfluss auf das Krankheitsgeschehen kardiovaskulärer Erkrankungen haben [107, 110, 111, 112]. Auch diese Ergebnisse gliederten sich in das Bild der zuvor beschriebenen Daten ein. Wir fanden

eine signifikante Steigerung im Vorkommen beider Gelatinasen in der Gruppe CVB3. Die Gruppe IL6RAB CVB3 wies im Vergleich hierzu einen deutlich geringeren Anstieg auf. Der Unterschied ist als signifikant zu werten. Für nicht-infektiöse Kardiomyopathien konnte bereits gezeigt werden, dass sich eine Expressionshemmung von MMP-2 und MMP-9 positiv auf den Verlauf der Erkrankung auswirkt [225, 226, 227, 228]. MMP-2 und MMP-9 werden im Rahmen einer kardialen Inflammation verstärkt exprimiert, was ebenfalls mit einem überschießenden kardialen Remodeling assoziiert ist [229]. Arbeiten anderer Arbeitsgruppen haben den positiven Einfluss von IL-6 auf die Freisetzung von MMP-9 beschrieben [113]. Dies könnte eine Erklärung für die starke Reduktion von MMP-9 bei IL-6 Blockade sein. Für MMP-2 ist ein solcher Zusammenhang noch nicht belegt. Westermann et al. konnten zeigen, dass MMP-2 ein substantieller Negativregulator im Rahmen der Immunreaktion nach CVB3 induzierter Myokarditis ist und sich ein vollständiger Mangel in überschießender Inflammation und kardialer Funktionseinbuße äußert [112]. Es kann daher nicht zwangsläufig als positiv gelten, die Expression der Gelatinasen zu hemmen. Einschränkend muss jedoch gesagt werden, dass der immunhistochemische Nachweis der Gelatinasen allein kein differenziertes Bild abgeben kann, ein Aktivitätsnachweis mittels Zymographie könnte hier weitere Aufschlüsse geben. Neben dem Abbau von Kollagen stehen MMPs mit verschiedenen immunologischen Vorgängen in Wechselwirkung [230], daher fällt eine kausale Zuordnung spezifischer Effekte dieses Ergebnisses schwer. Es kann jedoch davon ausgegangen werden, dass das vermehrte Vorkommen der MMPs von einer gesteigerten Aktivität derselben begleitet ist. Dies führt im Allgemeinen zu verstärkten extrazellulären Umbauvorgängen und würde sich hier ebenfalls in myokardialer Funktionseinschränkung äußern. Die genaue Beurteilung des Remodelings ist jedoch in diesem akuten Modell nicht durchführbar. Ein Modell, welches gerade die postinfektiöse Phase näher untersucht, beispielsweise das 28 Tage Modell, könnte hier größeren Aufschluss bieten.

5.5 Hämodynamische Funktion

Die Erfassung der hämodynamischen Funktion mittels Konduktanzkatheter-Messung stellt ein Verfahren zur objektiven Beurteilung der Auswirkungen myokardialer Schädigung nach viraler Myokarditis dar. Die klinische Beobachtung der krankheitsbedingten Einbußen der Herzfunktion hingegen kann dem Kriterium der Objektivierbarkeit hier nicht standhalten. Dennoch unterliegt die Erfassung der kardialen Funktion starker Schwankungen, weshalb es wichtig ist, dass alle Messungen einer Studie nur von einer Person ausgeführt werden, um Unterschiede, die durch den Untersucher bedingt sind so gering wie möglich zu halten. Der Ort der bedeutendsten Manifestation kardialer Einbußen ist der linke Ventrikel und die linksventrikuläre Dysfunktion stellt klinisch die gravierendste Folge der Virusmyokarditis dar [231]. Daher erfolgte die Evaluation der kardialen Funktion stellvertretend für das gesamte Organ im linken Ventrikel, wo zu erwarten war, dass sich der therapeutische Erfolg einer

Intervention dokumentieren ließ. Zu Beginn der Studie wiesen alle Tiere gleiche Bedingungen im Hinblick auf Körpergewicht und Größe auf. Bei der hämodynamischen Evaluation der Tiere zeigten die behandelten nicht infizierten Tiere (IgG) keinen relevanten Unterschied in der systolischen und diastolischen Funktion im Vergleich zu der Kontrollgruppe (Ko), was belegt, dass die Anti-IL-6-Therapie selbst keine Auswirkung auf die Hämodynamik der Tiere hat.

Die Ergebnisse der Konduktanzkatheter-Untersuchung werden nach ihrer Bedeutung für den Herzzyklus in die drei Kategorien der globalen Funktion, der systolischen- sowie der diastolischen Herzfunktion eingeteilt. Zur globalen Funktion zählen HR, P_{\max} , SV, SW, EF, das CO sowie der Cardiac Index (CI). In den globalen Parametern lassen sich, bezogen auf alle Messgrößen, abgesehen von der Herzfrequenz, signifikante Einbußen bei den Tieren verzeichnen, die das Virus appliziert bekommen haben. Hier zeigt sich, dass die Tiere eine Myokarditis entwickelten und die kardiale Funktion hierdurch deutlich beeinträchtigt ist. Einbußen des P_{\max} und der dP/dt_{\max} bilden die frühen Zeichen für eine eingeschränkte Pumpfunktion im Rahmen der viralen Myokarditis [191]. Bezogen auf die SW, das CO, den CI und die EF, konnten wir bei den Tieren, die eine Behandlung mit dem IL6RAB erhalten haben, eine signifikante Verbesserung gegenüber der Gruppe CVB3 messen. Dies kann als positiver Effekt der Behandlung mit IL6RAB, bezogen auf die globale Herzfunktion, betrachtet gewertet werden.

Die Parameter systolischen Herzfunktion stellen das LVESV, der LVESP und die dP/dt_{\max} dar. Eine myokardiale Schädigung durch virale Infektion führt zu einer reduzierten Kontraktilität durch Beeinträchtigung der Zellinteraktion und kardialen Architektur. Es kommt zu einer Abnahme des LVESP und der dP/dt_{\max} . Die dP/dt_{\max} wird allgemein als Parameter für die Kontraktilität gewertet, ist jedoch abhängig von der Herzfrequenz [191]. Wie erwartet konnten nach Infektion neben den Einschränkungen der gesamten kardialen Funktion in der Gruppe CVB3 auch deutliche Einbußen bei den Parametern, die isoliert die Systole beschreiben, verzeichnet werden. Das LVESV blieb hierbei konstant, was sich mit den Ergebnissen anderer Studien zur akuten Myokarditis deckt [192]. Die Volumenparameter ändern sich erst durch Ventrikeldilatation, was sich in der akuten Phase noch nicht abzeichnet [191]. Sowohl die LVESP, wie auch die dP/dt_{\max} , waren in der Gruppe CVB3 verglichen mit den Kontrolltieren (Ko) deutlich reduziert. Dies ist als ein Zeichen für die erfolgreiche Induktion der viralen Myokarditis zu werten. In der Gruppe IL6RAB CVB3 zeigte sich ebenfalls eine reduzierte Kontraktilität im Vergleich zu den gesunden Tieren (Ko). In Gegenüberstellung der dP/dt_{\max} -Werte von CVB3 und IL6RAB CVB3 zeigte sich jedoch ein signifikanter Vorteil für IL6RAB CVB3. Der Vergleich zwischen Ko und IgG ergab keinen Unterschied. Die dargestellten Ergebnisse sind somit als Beleg für den protektiven Effekt der durchgeführten Intervention in Bezug auf die systolische Funktion nach Infektion zu werten.

Der diastolischen Funktion ist im Rahmen der vorliegenden Studie ein besonderer Wert zuzumessen, da eine Einschränkung der Diastole für die Pathophysiologie der Myokardi-

tis bei Patienten charakteristisch ist [232, 233]. Aber auch in Tiermodellen zeigen sich die Einschränkungen in der Füllungsphase sehr früh im Verlauf der inflammatorischen Kardiomyopathie [191]. Die Beeinträchtigung der Diastole führt zu einer verringerten Durchblutung des Myokards und wirkt sich somit auch negativ auf die Pumpfunktion aus. Die Ergebnisse der diastolischen Funktion fügen sich in das Gesamtbild der akuten Herzinsuffizienz ein. Charakterisiert wird die diastolische Funktion durch die Werte LVEDV, LVEDP, dP/dt_{\min} , τ , PHT und die Ventrikelsteifigkeitskonstante (β). Für alle Werte, abgesehen vom LVEDV, weisen die Tiere der Gruppe CVB3 deutliche Einbußen gegenüber den gesunden Tieren (Ko) auf. Im Vergleich der Gruppe IL6RAB CVB3 mit den Tieren der Gruppe CVB3 imponiert hingegen eine signifikante Verbesserung bezogen diese Parameter nach IL-6 Blockade. Der LVEDP als sehr globaler Parameter der Diastole zeigt die diastolische Dysfunktion deutlich an. Erklärbar ist dieser hohe Druck vermutlich durch eine Verkürzung der Füllungsphase und eine erhöhte Steifigkeit des Ventrikelmyokards. Die Steifigkeit zeigt sich durch die Steigerung von β . Die Veränderungen bei τ zeigen, dass diese Einschränkungen schon in der frühen Diastole bestehen. Die direkte Beteiligung von IL-6 und TNF- α an der Pathogenese der akuten Herzinsuffizienz ist belegt [193]. Es kann also vermutet werden, dass die Blockade von IL-6, die mit einer gleichzeitigen Reduktion von TNF- α einhergeht (siehe 4.4.2), sich in diesem Rahmen direkt positiv auf das Krankheitsgeschehen auswirkt. Wahrscheinlicher ist jedoch, dass die gesamte Reduktion der Inflammation, welche mit geringerem Immunzellinfiltrat und vor allem reduziertem Remodling assoziiert ist, für diese signifikanten Unterschiede verantwortlich ist.

5.6 Methodenkritik

Um Rückschlüsse auf die Relevanz der Blockade des Zytokins IL-6 auf die hämodynamische Funktion, im multifaktoriellen Geschehen der viralen Myokarditis zu ziehen, haben wir ein etabliertes Tiermodell, der CVB3-induzierten Myokarditis bei der Maus, genutzt. Ergänzend hierzu fanden diverse molekularbiologische und immunhistochemische Verfahren, zur Verifizierung der hämodynamischen Daten, Anwendung. In der Zellkultur konnten wir sehr isoliert die Expression von IL-6 in einzelnen Zelllinien darstellen, was für ein kausales Verständnis der gefundenen Zytokinmuster essentiell ist.

Die Untersuchung der Funktion des Herzens ist nur in einem lebenden Organismus möglich. Die Maus ist die sinnesphysiologisch am niedrigsten stehende Tierart, an dem dieses Vorhaben technisch möglich ist. Es erschien uns daher aufgrund der Komplexität des inflammatorischen Prozesses unerlässlich, hier die Maus als Versuchstier zu nutzen. Weiter sprechen für die Maus die Vergleichbarkeit mit anderen Studienergebnissen sowie die Argumente der guten Verfügbarkeit und des geringen Aufwands, was die Haltung und Behandlung betrifft. Es war uns hierbei stets bewusst, dass physiologische Unterschiede zwischen murinem und humanem Organismus bestehen [234], die einer Eins-zu-eins-Verwertbarkeit entgegenstehen.

Es ging in diesem Versuch jedoch mehr um ein *Proof of concept*, als um eine detaillierte Dosisanpassung für eine eventuelle Therapie.

Die Technik der Konduktanzkatheter-Untersuchung an sich gilt als sehr valide Methode zur Charakterisierung der Herzfunktion in vivo [185]. Als alternative Methode, die vergleichbar gute Ergebnisse liefert, ist lediglich die kardiale Magnetresonanztomographie (MRT) zu sehen, welches jedoch aufgrund der Verfügbarkeit nicht als wirkliche Alternative in Betracht kam. Eine Evaluation der Herzfunktion mittels Sonographie wäre ein Kompromiss zwischen bildgebendem Verfahren, welches gut verfügbar ist und einer wenig invasiven Messmethode, welche auch am wachen Tier durchgeführt werden kann, doch muss man hier auf wichtige Informationen verzichten, die uns die Konduktanzkatheter-Methode liefert. Im Besonderen sind hier die vor- und nachlastunabhängigen Parameter zu nennen, die bei dieser Methode mit erfasst werden. Neben der Invasivität der Methode besteht ein Nachteil in der Notwendigkeit zur Messung der parallelen Konduktanz durch Injektion 10% NaCl über die Vena jugularis [235]. Sowohl die Volumenbelastung, als auch die osmotisch wirksame Lösung wirken sich auf die Herzfunktion der Tiere aus. Daher haben wir die Steady State Messungen immer vor der NaCl-Applikation durchgeführt.

Um ein möglichst isoliertes Bild der Herzfunktion zu erlangen, war es notwendig, die Tiere für die Operation und Messung in Narkose zu versetzen. Es galt hierbei eine Balance zu finden zwischen der Elimination von Schmerzreizen, um die Messung nicht durch Stress zu beeinflussen, und dem Vermeiden einer Überdosierung der Narkosemittel, die an sich eine kardiodepressive Wirkung entfalten können. Um diese Störgröße möglichst nicht als beeinflussenden Faktor in die Messung einfließen zu lassen, gaben wir die Narkosemittel (Thiopental/Buprenorphin) gewichtsadaptiert und steigerten bei Bedarf nach einem standardisierten Vorgehen. Experimente an nicht narkotisierten Mäusen sind zwar gezeigt worden [236], waren jedoch aufgrund der Invasivität des Eingriffs und der hiermit verbundenen Schmerzreize für unser Vorgehen nicht möglich. Auch müssen Tierschutzbedenken hier gegen den wissenschaftlichen Zusatznutzen abgewogen werden.

Die Immunhistochemie ist eine valide Methode zum Nachweis einzelner Oberflächenantigene und kann eine sehr genaue Auskunft über das mengenmäßige Vorkommen bestimmter Strukturen in untersuchten Geweben liefern. Es darf jedoch nicht vergessen werden, dass nur gefunden werden kann, was auch gesucht wird und der Nachweis des Vorhandenseins keine Auskunft über den Mechanismus liefern kann. Ähnliches gilt auch für den Nachweis von mRNA-Sequenzen mittels PCR.

Das Zellkultur-Modell welches wir einsetzten, um die Zellen auszumachen, welche maßgeblich IL-6 im Myokard produzieren bzw. wie sie auf eine Infektion mit CVB3 reagieren, ist ein isoliertes und artifizielles Modell. Es gliedert sich jedoch sehr gut in die Versuchsrichtung von der großen Struktur zur immer kleineren zu gelangen.

Abschließend lässt sich sagen, dass alle Methoden für sich genommen einen wissenschaftlichen Ausschnitt einer lebendigen Wirklichkeit darstellen und uns erst die Zusammenschau

aller Ergebnisse eine Information über den Mechanismus der Erkrankung bzw. der hier untersuchten Intervention bieten kann. Um diese grundlagenwissenschaftlichen Ergebnisse für die Humanmedizin nutzbar zu machen bedarf es jedoch noch weiterer intensiver - vor allem klinischer - Untersuchungen.

Literatur

- [1] T. W. Mattingly. Changing concepts of myocardial diseases. *JAMA*, 191:33–7, 1965.
- [2] H. T. Aretz. Diagnosis of myocarditis by endomyocardial biopsy. *Med Clin North Am*, 70(6):1215–26, 1986. Aretz, H TMed Clin North Am. 1986 Nov;70(6):1215-26.
- [3] Kenneth L Baughman. Diagnosis of myocarditis: death of dallas criteria. *Circulation*, 113(4):593–595, Jan 2006.
- [4] B. Maisch, I. Portig, A. Ristic, G. Hufnagel, and S. Pankuweit. Definition of inflammatory cardiomyopathy (myocarditis): on the way to consensus. a status report. *Herz*, 25(3):200–9, 2000.
- [5] J. W. Magnani and G. W. Dec. Myocarditis: current trends in diagnosis and treatment. *Circulation*, 113(6):876–90, 2006.
- [6] P. Libby Braunwald and E. *Braunwald's heart disease: a textbook of cardiovascular medicine, 8th ed edition*. Saunders/Elsevier, Philadelphia, 2008.
- [7] E. A. Hahn, V. L. Hartz, T. E. Moon, J. B. O'Connell, A. Herskowitz, B. M. McManus, and J. W. Mason. The myocarditis treatment trial: design, methods and patients enrollment. *Eur Heart J*, 16 Suppl O:162–7, 1995.
- [8] B. J. Maron, J. J. Doerer, T. S. Haas, D. M. Tierney, and F. O. Mueller. Sudden deaths in young competitive athletes: analysis of 1866 deaths in the united states, 1980-2006. *Circulation*, 119(8):1085–92, 2009.
- [9] S. Gupta, D. W. Markham, M. H. Drazner, and P. P. Mammen. Fulminant myocarditis. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*, 5(11):693–706, 2008.
- [10] R Kandolf. Diagnosis of myocarditis. *Dtsch Med Wochenschr*, 136(16):829–835, Apr 2011.
- [11] C. Elamm, D. Fairweather, and L. T. Cooper. Pathogenesis and diagnosis of myocarditis. *Heart*, 98(11):835–40, 2012.
- [12] D. Fairweather, K. A. Stafford, and Y. K. Sung. Update on coxsackievirus b3 myocarditis. *Curr Opin Rheumatol*, 2012. Curr Opin Rheumatol. 2012 Apr 5.
- [13] K U Knowlton. Cvb infection and mechanisms of viral cardiomyopathy. *Curr Top Microbiol Immunol*, 323:315–335, 2008.
- [14] J. F. Woodruff and J. J. Woodruff. Involvement of t lymphocytes in the pathogenesis of coxsackie virus b3 heart disease. *J Immunol*, 113(6):1726–34, 1974.
- [15] G L Freeman, J T Colston, M Zabalgoitia, and B Chandrasekar. Contractile depression and expression of proinflammatory cytokines and inos in viral myocarditis. *Am J Physiol*, 274(1 Pt 2):H249–58, Jan 1998.
- [16] A D'Ambrosio, G Patti, A Manzoli, G Sinagra, A Di Lenarda, F Silvestri, and G Di Sciascio. The fate of acute myocarditis between spontaneous improvement and evolution to dilated cardiomyopathy: a review. *Heart*, 85(5):499–504, May 2001.
- [17] Uwe Kuhl and Heinz-Peter Schultheiss. Myocarditis: early biopsy allows for tailored regenerative treatment. *Dtsch Arztebl Int*, 109(20):361–368, May 2012.
- [18] H. P. Schultheiss and U. Kuhl. Why is diagnosis of infectious myocarditis such a challenge? *Expert Rev Anti Infect Ther*, 9(12):1093–5, 2011.
- [19] E B Lieberman, G M Hutchins, A Herskowitz, N R Rose, and K L Baughman. Clinicopathologic description of myocarditis. *J Am Coll Cardiol*, 18(7):1617–1626, Dec 1991.
- [20] R E 3rd McCarthy, J P Boehmer, R H Hruban, G M Hutchins, E K Kasper, J M Hare, and K L Baughman. Long-term outcome of fulminant myocarditis as compared with acute (nonfulminant) myocarditis. *N Engl J Med*, 342(10):690–695, Mar 2000.
- [21] L T Jr Cooper, G J Berry, and R Shabetai. Idiopathic giant-cell myocarditis—natural history and treatment. multicenter giant cell myocarditis study group investigators. *N Engl J Med*, 336(26):1860–1866, Jun 1997.

- [22] Kalim U Aziz, Najma Patel, Tareen Sadullah, Habiba Tasneem, Hasina Thawerani, and Saeed Talpur. Acute viral myocarditis: role of immunosuppression: a prospective randomised study. *Cardiol Young*, 20(5):509–515, Oct 2010.
- [23] Uwe Kuhl, D Lassner, Jessica von Schlippenbach, Wolfgang Poller, and Heinz-Peter Schultheiss. Interferon-beta improves survival in enterovirus-associated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*, 60(14):1295–1296, Oct 2012.
- [24] G Dalldorf and G M Sickles. An unidentified, filtrable agent isolated from the feces of children with paralysis. *Science*, 108(2794):61–62, Jul 1948.
- [25] N Iizuka, S Kuge, and A Nomoto. Complete nucleotide sequence of the genome of coxsackievirus b1. *Virology*, 156(1):64–73, Jan 1987.
- [26] M G Rossmann and A C Palmenberg. Conservation of the putative receptor attachment site in picornaviruses. *Virology*, 164(2):373–382, Jun 1988.
- [27] Yu Shi, Chen Chen, Ulrike Lisewski, Uta Wrackmeyer, Michael Radke, Dirk Westermann, Martina Sauter, Carsten Tschöpe, Wolfgang Poller, Karin Klingel, and Michael Gotthardt. Cardiac deletion of the coxsackievirus-adenovirus receptor abolishes coxsackievirus b3 infection and prevents myocarditis in vivo. *J Am Coll Cardiol*, 53(14):1219–1226, Apr 2009.
- [28] G DALLDORF. The coxsackie viruses. *Annu Rev Microbiol*, 9:277–296, 1955.
- [29] J GEAR and V MEASROCH. Cases of meningo-encephalitis due to the coxsackie a-like echo 9 virus. *S Afr Med J*, 32(44):1062–1066, Nov 1958.
- [30] E C CURNEN. Human disease associated with the coxsackie viruses. *Bull N Y Acad Med*, 26(5):335–342, May 1950.
- [31] M. Esfandiarei and B. M. McManus. Molecular biology and pathogenesis of viral myocarditis. *Annual Review of Pathology Mechanisms of Disease*, 3:127–55, 2008.
- [32] Tsutomu Yoshikawa, Akiyasu Baba, and Yuji Nagatomo. Autoimmune mechanisms underlying dilated cardiomyopathy. *Circ J*, 73(4):602–607, Apr 2009.
- [33] D. Fairweather, Z. Kaya, G. R. Shellam, C. M. Lawson, and N. R. Rose. From infection to autoimmunity. *J Autoimmun*, 16(3):175–86, 2001.
- [34] Noel R Rose. Myocarditis: infection versus autoimmunity. *J Clin Immunol*, 29(6):730–737, Nov 2009.
- [35] D. Fairweather, S. Frisancho-Kiss, and N. R. Rose. Viruses as adjuvants for autoimmunity: evidence from coxsackievirus-induced myocarditis. *Rev Med Virol*, 15(1):17–27, 2005.
- [36] Chandrasegaran Massilamany, Bijaya Upadhyaya, Arunakumar Gangaplara, Charles Kuszynski, and Jay Reddy. Detection of autoreactive cd4 t cells using major histocompatibility complex class ii dextramers. *BMC Immunol*, 12:40, 2011.
- [37] Arunakumar Gangaplara, Chandrasegaran Massilamany, Deborah M Brown, Gustavo Delhon, Asit K Pattnaik, Nora Chapman, Noel Rose, David Steffen, and Jay Reddy. Coxsackievirus b3 infection leads to the generation of cardiac myosin heavy chain-alpha-reactive cd4 t cells in a/j mice. *Clin Immunol*, 144(3):237–249, Sep 2012.
- [38] Kasper Hoebe, Edith Janssen, and Bruce Beutler. The interface between innate and adaptive immunity. *Nat Immunol*, 5(10):971–974, Oct 2004.
- [39] C. Kawai. From myocarditis to cardiomyopathy: mechanisms of inflammation and cell death learning from the past for the future. *Circulation*, 99(8):1091–100, 1999.
- [40] F. M. Wilson, Q. R. Miranda, J. L. Chason, and A. M. Lerner. Residual pathologic changes following murine coxsackie a and b myocarditis. *Am J Pathol*, 55(2):253–65, 1969.
- [41] N. R. Rose and S. L. Hill. The pathogenesis of postinfectious myocarditis. *Clin Immunol Immunopathol*, 80(3 Pt 2):S92–9, 1996.
- [42] B. M. McManus, L. H. Chow, J. E. Wilson, D. R. Anderson, J. M. Gulizia, C. J. Gauntt, K. E. Klingel, K. W. Beisel, and R. Kandolf. Direct myocardial injury by enterovirus: a central role in the evolution of murine myocarditis. *Clin Immunol Immunopathol*, 68(2):159–69, 1993.

- [43] T Shioi, A Matsumori, and S Sasayama. Persistent expression of cytokine in the chronic stage of viral myocarditis in mice. *Circulation*, 94(11):2930–2937, Dec 1996.
- [44] A Matsumori. Molecular and immune mechanisms in the pathogenesis of cardiomyopathy—role of viruses, cytokines, and nitric oxide. *Jpn Circ J*, 61(4):275–291, Apr 1997.
- [45] L. H. Chow, K. W. Beisel, and B. M. McManus. Enteroviral infection of mice with severe combined immunodeficiency. evidence for direct viral pathogenesis of myocardial injury. *Lab Invest*, 66(1):24–31, 1992.
- [46] M. Herzum, V. Ruppert, B. Kuytz, H. Jomaa, I. Nakamura, and B. Maisch. Coxsackievirus b3 infection leads to cell death of cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol*, 26(7):907–13, 1994.
- [47] C. Badorff, G. H. Lee, B. J. Lamphear, M. E. Martone, K. P. Campbell, R. E. Rhoads, and K. U. Knowlton. Enteroviral protease 2a cleaves dystrophin: evidence of cytoskeletal disruption in an acquired cardiomyopathy. *Nat Med*, 5(3):320–6, 1999.
- [48] Alexander Rassmann, Ulrike Martin, Hans-Peter Saluz, Stefan Peter, Thomas Munder, and Andreas Henke. Identification of gene expression profiles in hela cells and hepg2 cells infected with coxsackievirus b3. *J Virol Methods*, 187(1):190–194, Jan 2013.
- [49] Antti Saraste, Anita Arola, Tytti Vuorinen, Ville Kytö, Markku Kallajoki, Kari Pulkki, Liisa-Maria Voipio-Pulkki, and Timo Hyypiä. Cardiomyocyte apoptosis in experimental coxsackievirus {B3} myocarditis. *Cardiovascular Pathology*, 12(5):255 – 262, 2003.
- [50] R van Furth, Z A Cohn, J G Hirsch, J H Humphrey, W G Spector, and H L Langevoort. The mononuclear phagocyte system: a new classification of macrophages, monocytes, and their precursor cells. *Bull World Health Organ*, 46(6):845–852, 1972.
- [51] M Rabinovitch. Phagocytosis: the engulfment stage. *Semin Hematol*, 5(2):134–155, Apr 1968.
- [52] R N Barker, L-P Erwig, K S K Hill, A Devine, W P Pearce, and A J Rees. Antigen presentation by macrophages is enhanced by the uptake of necrotic, but not apoptotic, cells. *Clin Exp Immunol*, 127(2):220–225, Feb 2002.
- [53] Daniela Cihakova and Noel R Rose. Pathogenesis of myocarditis and dilated cardiomyopathy. *Adv Immunol*, 99:95–114, 2008.
- [54] Jobert G Barin, Noel R Rose, and Daniela Cihakova. Macrophage diversity in cardiac inflammation: a review. *Immunobiology*, 217(5):468–475, May 2012.
- [55] Alexei Gratchev, Igor Sobenin, Alexander Orekhov, and Julia Kzhyshkowska. Monocytes as a diagnostic marker of cardiovascular diseases. *Immunobiology*, 217(5):476 – 482, 2012. Cardiovascular Immunology.
- [56] K. M. Murphy, P. Travers, and M. Walport. *Janeway’s Immunobiology*, volume 7. Taylor & Francis, 2008.
- [57] C A Biron, K B Nguyen, G C Pien, L P Cousens, and T P Salazar-Mather. Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annu Rev Immunol*, 17:189–220, 1999.
- [58] P. A. Lodge, M. Herzum, J. Olszewski, and S. A. Huber. Coxsackievirus b-3 myocarditis. acute and chronic forms of the disease caused by different immunopathogenic mechanisms. *Am J Pathol*, 128(3):455–63, 1987.
- [59] Y Seko, Y Shinkai, A Kawasaki, H Yagita, K Okumura, and Y Yazaki. Evidence of perforin-mediated cardiac myocyte injury in acute murine myocarditis caused by coxsackie virus b3. *J Pathol*, 170(1):53–58, May 1993.
- [60] Y. Seko, N. Takahashi, H. Yagita, K. Okumura, and Y. Yazaki. Expression of cytokine mrnas in murine hearts with acute myocarditis caused by coxsackievirus b3. *J Pathol*, 183(1):105–8, 1997.
- [61] D. Fairweather and N. R. Rose. Inflammatory heart disease: a role for cytokines. *Lupus*, 14(9):646–51, 2005.
- [62] Taro Kawai and Shizuo Akira. Innate immune recognition of viral infection. *Nat Immunol*, 7(2):131–137, Feb 2006.

- [63] Eric M Pietras, Supriya K Saha, and Genhong Cheng. The interferon response to bacterial and viral infections. *J Endotoxin Res*, 12(4):246–250, 2006.
- [64] Simon A Jones. Directing transition from innate to acquired immunity: defining a role for il-6. *J Immunol*, 175(6):3463–3468, Sep 2005.
- [65] K.M. Murphy, P. Travers, M. Walport, K. Mahlke, L. Seidler, and I. Haufßer-Siller. *Immunologie*. Spektrum Akademischer Verlag, 2009.
- [66] A. Matsumori, N. Tomioka, and C. Kawai. Protective effect of recombinant alpha interferon on coxsackievirus b3 myocarditis in mice. *Am Heart J*, 115(6):1229–32, 1988.
- [67] R. Deonarain, D. Cerullo, K. Fuse, P. P. Liu, and E. N. Fish. Protective role for interferon-beta in coxsackievirus b3 infection. *Circulation*, 110(23):3540–3, 2004.
- [68] Uwe Kuhl, Matthias Pauschinger, Peter Lothar Schwimmbeck, Bettina Seeberg, Conny Lober, Michel Noutsias, Wolfgang Poller, and Heinz-Peter Schultheiss. Interferon-beta treatment eliminates cardiotropic viruses and improves left ventricular function in patients with myocardial persistence of viral genomes and left ventricular dysfunction. *Circulation*, 107(22):2793–2798, Jun 2003.
- [69] DeLisa Fairweather, Sylvia Frisancho-Kiss, Susy A Yusung, Masheka A Barrett, Sarah E Davis, Shannon J L Gatewood, Dolores B Njoku, and Noel R Rose. Interferon-gamma protects against chronic viral myocarditis by reducing mast cell degranulation, fibrosis, and the profibrotic cytokines transforming growth factor-beta 1, interleukin-1 beta, and interleukin-4 in the heart. *Am J Pathol*, 165(6):1883–1894, Dec 2004.
- [70] Delisa Fairweather, Sylvia Frisancho-Kiss, Shannon Gatewood, Dolores Njoku, Ronelle Steele, Masheka Barrett, and Noel R Rose. Mast cells and innate cytokines are associated with susceptibility to autoimmune heart disease following coxsackievirus b3 infection. *Autoimmunity*, 37(2):131–145, Mar 2004.
- [71] J R Lane, D A Neumann, A Lafond-Walker, A Herskowitz, and N R Rose. Role of il-1 and tumor necrosis factor in coxsackie virus-induced autoimmune myocarditis. *J Immunol*, 151(3):1682–1690, Aug 1993.
- [72] R. Asherson, A. Doria, and P. Pauletto. *The Heart in Systemic Autoimmune Diseases*. Handbook of Systemic Autoimmune Diseases. Elsevier Science, 2004.
- [73] T. Tanaka, T. Kanda, B. M. McManus, H. Kanai, H. Akiyama, K. Sekiguchi, T. Yokoyama, and M. Kurabayashi. Overexpression of interleukin-6 aggravates viral myocarditis: impaired increase in tumor necrosis factor-alpha. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 33(9):1627–35, 2001.
- [74] Chen Dong. Th17 cells in development: an updated view of their molecular identity and genetic programming. *Nat Rev Immunol*, 8(5):337–348, May 2008.
- [75] T R Mosmann and S Sad. The expanding universe of t-cell subsets: Th1, th2 and more. *Immunol Today*, 17(3):138–146, Mar 1996.
- [76] G Tosato and S E Pike. Interferon-beta 2/interleukin 6 is a co-stimulant for human t lymphocytes. *J Immunol*, 141(5):1556–1562, Sep 1988.
- [77] L H Elson, T B Nutman, D D Metcalfe, and C Prussin. Flow cytometric analysis for cytokine production identifies t helper 1, t helper 2, and t helper 0 cells within the human cd4+cd27- lymphocyte subpopulation. *J Immunol*, 154(9):4294–4301, May 1995.
- [78] Estelle Bettelli, Yijun Carrier, Wenda Gao, Thomas Korn, Terry B Strom, Mohamed Oukka, Howard L Weiner, and Vijay K Kuchroo. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector th17 and regulatory t cells. *Nature*, 441(7090):235–238, May 2006.
- [79] Paul R Mangan, Laurie E Harrington, Darrell B O’Quinn, Whitney S Helms, Daniel C Bullard, Charles O Elson, Robin D Hatton, Sharon M Wahl, Trenton R Schoeb, and Casey T Weaver. Transforming growth factor-beta induces development of the t(h)17 lineage. *Nature*, 441(7090):231–234, May 2006.
- [80] Xuexian O Yang, Athanasia D Panopoulos, Roza Nurieva, Seon Hee Chang, Demin Wang, Stephanie S Watowich, and Chen Dong. Stat3 regulates cytokine-mediated generation of inflammatory helper t cells. *J Biol Chem*, 282(13):9358–9363, Mar 2007.

- [81] P L Schwimmbeck, C Badorff, G Rohn, K Schulze, and H P Schultheiss. The role of sensitized t-cells in myocarditis and dilated cardiomyopathy. *Int J Cardiol*, 54(2):117–125, May 1996.
- [82] C Kishimoto and W H Abelmann. Monoclonal antibody therapy for prevention of acute coxsackievirus b3 myocarditis in mice. *Circulation*, 79(6):1300–1308, Jun 1989.
- [83] A Henke, S Huber, A Stelzner, and J L Whitton. The role of cd8+ t lymphocytes in coxsackievirus b3-induced myocarditis. *J Virol*, 69(11):6720–6728, Nov 1995.
- [84] Zhijian Yu, Zhen Huang, Chongwen Shao, Yuanjian Huang, Fan Zhang, Jin Yang, Lili Deng, Zhongming Zeng, Qiwen Deng, and Weiseng Zeng. Oral administration of interferon-alpha2b-transformed bifidobacterium longum protects balb/c mice against coxsackievirus b3-induced myocarditis. *Virol J*, 8:525, 2011.
- [85] Wei Liu and Sally A Huber. Cross-talk between cd1d-restricted nkt cells and gammadelta cells in t regulatory cell response. *Virol J*, 8:32, 2011.
- [86] S. Frisancho-Kiss, S. E. Davis, J. F. Nyland, J. A. Frisancho, D. Cihakova, M. A. Barrett, N. R. Rose, and D. Fairweather. Cutting edge: cross-regulation by tlr4 and t cell ig mucin-3 determines sex differences in inflammatory heart disease. *J Immunol*, 178(11):6710–4, 2007.
- [87] Eric D Abston, Michael J Coronado, Adriana Bucek, Djahida Bedja, Jaewook Shin, Joseph B Kim, Eunyong Kim, Kathleen L Gabrielson, Dimitrios Georgakopoulos, Wayne Mitzner, and DeLisa Fairweather. Th2 regulation of viral myocarditis in mice: different roles for tlr3 versus trif in progression to chronic disease. *Clin Dev Immunol*, 2012:129486, 2012.
- [88] Michael J Coronado, Jessica E Brandt, Eunyong Kim, Adriana Bucek, Djahida Bedja, Eric D Abston, Jaewook Shin, Kathleen L Gabrielson, Wayne Mitzner, and DeLisa Fairweather. Testosterone and interleukin-1beta increase cardiac remodeling during coxsackievirus b3 myocarditis via serpin a 3n. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 302(8):H1726–36, Apr 2012.
- [89] G Christian Baldeviano, Jobert G Barin, Monica V Talor, Sachin Srinivasan, Djahida Bedja, Dongfeng Zheng, Kathleen Gabrielson, Yoichiro Iwakura, Noel R Rose, and Daniela Cihakova. Interleukin-17a is dispensable for myocarditis but essential for the progression to dilated cardiomyopathy. *Circ Res*, 106(10):1646–1655, May 2010.
- [90] Jennifer F Nyland, DeLisa Fairweather, Devon L Shirley, Sarah E Davis, Noel R Rose, and Ellen K Silbergeld. Low-dose inorganic mercury increases severity and frequency of chronic coxsackievirus-induced autoimmune myocarditis in mice. *Toxicol Sci*, 125(1):134–143, Jan 2012.
- [91] N. Tomioka, C. Kishimoto, A. Matsumori, and C. Kawai. Effects of prednisolone on acute viral myocarditis in mice. *J Am Coll Cardiol*, 7(4):868–72, 1986.
- [92] T A Martino, P Liu, and M J Sole. Viral infection and the pathogenesis of dilated cardiomyopathy. *Circ Res*, 74(2):182–188, Feb 1994.
- [93] Martin J Richer and Marc S Horwitz. The innate immune response: an important partner in shaping coxsackievirus-mediated autoimmunity. *J Innate Immun*, 1(5):421–434, 2009.
- [94] M. C. Poffenberger and M. S. Horwitz. Il-6 during viral-induced chronic autoimmune myocarditis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1173:318–25, 2009.
- [95] Urs Eriksson, Michael O Kurrer, Nicole Schmitz, Stephan C Marsch, Adriano Fontana, Hans-Pietro Eugster, and Manfred Kopf. Interleukin-6-deficient mice resist development of autoimmune myocarditis associated with impaired upregulation of complement c3. *Circulation*, 107(2):320–325, Jan 2003.
- [96] Tomomi Yamashita, Tomohiko Iwakura, Kazuki Matsui, Haruyo Kawaguchi, Masanori Obana, Akiko Hayama, Makiko Maeda, Yasukatsu Izumi, Issei Komuro, Yoshiyuki Ohsugi, Minoru Fujimoto, Tetsuji Naka, Tadamitsu Kishimoto, Hiroyuki Nakayama, and Yasushi Fujio. Il-6-mediated th17 differentiation through rorgamma1 is essential for the initiation of experimental autoimmune myocarditis. *Cardiovasc Res*, 91(4):640–648, Sep 2011.
- [97] Paras Kumar Mishra, Srikanth Givvmani, Vishalakshi Chavali, and Suresh C Tyagi. Cardiac matrix: a clue for future therapy. *Biochim Biophys Acta*, 1832(12):2271–2276, Dec 2013.
- [98] Francis G Spinale. Myocardial matrix remodeling and the matrix metalloproteinases: influence on cardiac form and function. *Physiol Rev*, 87(4):1285–1342, Oct 2007.

- [99] S. Heymans. Inflammation and cardiac remodeling during viral myocarditis. *Ernst Schering Research Foundation workshop*, (55):197–218, 2006.
- [100] J Schaper and B Speiser. The extracellular matrix in the failing human heart. *Basic Res Cardiol*, 87 Suppl 1:303–309, 1992.
- [101] J. E. Bishop and G. J. Laurent. Collagen turnover and its regulation in the normal and hypertrophying heart. *Eur Heart J*, 16 Suppl C:38–44, 1995. Bishop, J ELaurent, G JWellcome Trust/United KingdomENGLANDEur Heart J. 1995 May;16 Suppl C:38-44.
- [102] T K Borg and J B Caulfield. The collagen matrix of the heart. *Fed Proc*, 40(7):2037–2041, May 1981.
- [103] P K Mays, J E Bishop, and G J Laurent. Age-related changes in the proportion of types i and iii collagen. *Mech Ageing Dev*, 45(3):203–212, Nov 1988.
- [104] M. Pauschinger, D. Knopf, S. Petschauer, A. Doerner, W. Poller, P. L. Schwimmbeck, U. Kuhl, and H. P. Schultheiss. Dilated cardiomyopathy is associated with significant changes in collagen type i/iii ratio. *Circulation*, 99(21):2750–6, 1999.
- [105] Y Okada, K Naka, K Kawamura, T Matsumoto, I Nakanishi, N Fujimoto, H Sato, and M Seiki. Localization of matrix metalloproteinase 9 (92-kilodalton gelatinase/type iv collagenase = gelatinase b) in osteoclasts: implications for bone resorption. *Lab Invest*, 72(3):311–322, Mar 1995.
- [106] R T Aimes and J P Quigley. 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*, 270(11):5872–5876, Mar 1995.
- [107] Matthias Pauschinger, Kumaran Chandrasekharan, and Heinz-Peter Schultheiss. Myocardial remodeling in viral heart disease: possible interactions between inflammatory mediators and mmp-timp system. *Heart Fail Rev*, 9(1):21–31, Jan 2004.
- [108] Shunji Hayashidani, Hiroyuki Tsutsui, Masaki Ikeuchi, Tetsuya Shiomi, Hidenori Matsusaka, Toru Kubota, Kyoko Imanaka-Yoshida, Takeshi Itoh, and Akira Takeshita. Targeted deletion of mmp-2 attenuates early lv rupture and late remodeling after experimental myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 285(3):H1229–35, Sep 2003.
- [109] A Ducharme, S Frantz, M Aikawa, E Rabkin, M Lindsey, L E Rohde, F J Schoen, R A Kelly, Z Werb, P Libby, and R T Lee. Targeted deletion of matrix metalloproteinase-9 attenuates left ventricular enlargement and collagen accumulation after experimental myocardial infarction. *J Clin Invest*, 106(1):55–62, Jul 2000.
- [110] S. Heymans, B. Schroen, P. Vermeersch, H. Milting, F. Gao, A. Kassner, H. Gillijns, P. Herijgers, W. Flameng, P. Carmeliet, F. Van de Werf, Y. M. Pinto, and S. Janssens. Increased cardiac expression of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 is related to cardiac fibrosis and dysfunction in the chronic pressure-overloaded human heart. *Circulation*, 112(8):1136–44, 2005.
- [111] D. Westermann, K. Savvatis, H. P. Schultheiss, and C. Tschope. Immunomodulation and matrix metalloproteinases in viral myocarditis. *J Mol Cell Cardiol*, 48(3):468–73, 2010.
- [112] Dirk Westermann, Kostantinos Savvatis, Diana Lindner, Christin Zietsch, Peter Moritz Becher, Elke Hammer, Markus M Heimesaat, Stefan Bereswill, Uwe Volker, Felicitas Escher, Alexander Riad, Johanna Plendl, Karin Klingel, Wolfgang Poller, Heinz-Peter Schultheiss, and Carsten Tschope. Reduced degradation of the chemokine mcp-3 by matrix metalloproteinase-2 exacerbates myocardial inflammation in experimental viral cardiomyopathy. *Circulation*, 124(19):2082–2093, Nov 2011.
- [113] Poonam Kothari, Roberto Pestana, Rim Mesraoua, Rim Elchaki, K M Faisal Khan, Andrew J Danenberg, and Domenick J Falcone. Il-6-mediated induction of matrix metalloproteinase-9 is modulated by jak-dependent il-10 expression in macrophages. *J Immunol*, 192(1):349–357, Jan 2014.
- [114] J F Bazan. Haemopoietic receptors and helical cytokines. *Immunol Today*, 11(10):350–354, Oct 1990.
- [115] M A Febbraio, S Rose-John, and B K Pedersen. Is interleukin-6 receptor blockade the holy grail for inflammatory diseases? *Clin Pharmacol Ther*, 87(4):396–398, Apr 2010.
- [116] M Mihara, Y Moriya, T Kishimoto, and Y Ohsugi. Interleukin-6 (il-6) induces the proliferation of synovial fibroblastic cells in the presence of soluble il-6 receptor. *Br J Rheumatol*, 34(4):321–325, Apr 1995.

- [117] Mari A Nowell, Peter J Richards, Sankichi Horiuchi, Naoki Yamamoto, Stefan Rose-John, Nicholas Topley, Anwen S Williams, and Simon A Jones. Soluble il-6 receptor governs il-6 activity in experimental arthritis: blockade of arthritis severity by soluble glycoprotein 130. *J Immunol*, 171(6):3202–3209, Sep 2003.
- [118] S A Jones, S Horiuchi, N Topley, N Yamamoto, and G M Fuller. The soluble interleukin 6 receptor: mechanisms of production and implications in disease. *FASEB J*, 15(1):43–58, Jan 2001.
- [119] Tadimitsu Kishimoto. Interleukin-6: discovery of a pleiotropic cytokine. *Arthritis Res Ther*, 8 Suppl 2:S2, 2006.
- [120] J T Frieling, M van Deuren, J Wijdenes, J W van der Meer, C Clement, C J van der Linden, and R W Sauerwein. Circulating interleukin-6 receptor in patients with sepsis syndrome. *J Infect Dis*, 171(2):469–472, Feb 1995.
- [121] Stig E Hermansen, Trine Kalstad, Ole-Jakob How, and Truls Myrmet. Inflammation and reduced endothelial function in the course of severe acute heart failure. *Transl Res*, 157(3):117–127, Mar 2011.
- [122] T Kishimoto, T Hirano, T Kuritani, Y Yamamura, P Ralph, and R A Good. Induction of igg production in human b lymphoblastoid cell lines with normal human t cells. *Nature*, 271(5647):756–758, Feb 1978.
- [123] A Schimpl and E Wecker. Replacement of t-cell function by a t-cell product. *Nat New Biol*, 237(70):15–17, May 1972.
- [124] F Lee, T Yokota, T Otsuka, P Meyerson, D Villaret, R Coffman, T Mosmann, D Rennick, N Roehm, and C Smith. Isolation and characterization of a mouse interleukin cdna clone that expresses b-cell stimulatory factor 1 activities and t-cell- and mast-cell-stimulating activities. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83(7):2061–2065, Apr 1986.
- [125] Y Noma, P Sideras, T Naito, S Bergstedt-Lindquist, C Azuma, E Severinson, T Tanabe, T Kinashi, F Matsuda, and Y Yaoita. Cloning of cdna encoding the murine igg1 induction factor by a novel strategy using sp6 promoter. *Nature*, 319(6055):640–646, Feb 1986.
- [126] T Kinashi, N Harada, E Severinson, T Tanabe, P Sideras, M Konishi, C Azuma, A Tominaga, S Bergstedt-Lindqvist, and M Takahashi. Cloning of complementary dna encoding t-cell replacing factor and identity with b-cell growth factor ii. *Nature*, 324(6092):70–73, Nov 1986.
- [127] T Hirano, K Yasukawa, H Harada, T Taga, Y Watanabe, T Matsuda, S Kashiwamura, K Nakajima, K Koyama, and A Iwamatsu. Complementary dna for a novel human interleukin (bsf-2) that induces b lymphocytes to produce immunoglobulin. *Nature*, 324(6092):73–76, Nov 1986.
- [128] J Weissenbach, Y Chernajovsky, M Zeevi, L Shulman, H Soreq, U Nir, D Wallach, M Perricaudet, P Tiollais, and M Revel. Two interferon mRNAs in human fibroblasts: in vitro translation and escherichia coli cloning studies. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 77(12):7152–7156, Dec 1980.
- [129] J Content, L De Wit, D Pierard, R Derynck, E De Clercq, and W Fiers. Secretory proteins induced in human fibroblasts under conditions used for the production of interferon beta. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 79(9):2768–2772, May 1982.
- [130] A Zilberstein, R Ruggieri, J H Korn, and M Revel. Structure and expression of cdna and genes for human interferon-beta-2, a distinct species inducible by growth-stimulatory cytokines. *EMBO J*, 5(10):2529–2537, Oct 1986.
- [131] T Andus, T Geiger, T Hirano, H Northoff, U Ganter, J Bauer, T Kishimoto, and P C Heinrich. Recombinant human b cell stimulatory factor 2 (bsf-2/ifn-beta 2) regulates beta-fibrinogen and albumin mRNA levels in fao-9 cells. *FEBS Lett*, 221(1):18–22, Aug 1987.
- [132] J Gauldie, C Richards, D Harnish, P Lansdorp, and H Baumann. Interferon beta 2/b-cell stimulatory factor type 2 shares identity with monocyte-derived hepatocyte-stimulating factor and regulates the major acute phase protein response in liver cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84(20):7251–7255, Oct 1987.
- [133] Y Shabo, J Lotem, M Rubinstein, M Revel, S C Clark, S F Wolf, R Kamen, and L Sachs. The myeloid blood cell differentiation-inducing protein mgi-2a is interleukin-6. *Blood*, 72(6):2070–2073, Dec 1988.
- [134] M Kawano, T Hirano, T Matsuda, T Taga, Y Horii, K Iwato, H Asaoku, B Tang, O Tanabe, and H Tanaka. Autocrine generation and requirement of bsf-2/il-6 for human multiple myelomas. *Nature*, 332(6159):83–85, Mar 1988.

- [135] S Suematsu, T Matsusaka, T Matsuda, S Ohno, J Miyazaki, K Yamamura, T Hirano, and T Kishimoto. Generation of plasmacytomas with the chromosomal translocation t(12;15) in interleukin 6 transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(1):232–235, Jan 1992.
- [136] Jurgen Scheller and Stefan Rose-John. Interleukin-6 and its receptor: from bench to bedside. *Med Microbiol Immunol*, 195(4):173–183, Dec 2006.
- [137] Stefan Rose-John, Jurgen Scheller, Greg Elson, and Simon A Jones. Interleukin-6 biology is coordinated by membrane-bound and soluble receptors: role in inflammation and cancer. *J Leukoc Biol*, 80(2):227–236, Aug 2006.
- [138] J Grotzinger, T Kernebeck, K J Kallen, and S Rose-John. Il-6 type cytokine receptor complexes: hexamer, tetramer or both? *Biol Chem*, 380(7-8):803–813, Jul-Aug 1999.
- [139] J Grotzinger, G Kurupkat, A Wollmer, M Kalai, and S Rose-John. The family of the il-6-type cytokines: specificity and promiscuity of the receptor complexes. *Proteins*, 27(1):96–109, Jan 1997.
- [140] Martin J Boulanger, Dar-chone Chow, Elena E Brevnova, and K Christopher Garcia. Hexameric structure and assembly of the interleukin-6/il-6 alpha-receptor/gp130 complex. *Science*, 300(5628):2101–2104, Jun 2003.
- [141] S Rose-John and P C Heinrich. Soluble receptors for cytokines and growth factors: generation and biological function. *Biochem J*, 300 (Pt 2):281–290, Jun 1994.
- [142] P C Heinrich, I Behrmann, G Muller-Newen, F Schaper, and L Graeve. Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/jak/stat pathway. *Biochem J*, 334 (Pt 2):297–314, Sep 1998.
- [143] Annalisa Camporeale and Valeria Poli. Il-6, il-17 and stat3: a holy trinity in auto-immunity? *Front Biosci (Landmark Ed)*, 17:2306–2326, 2012.
- [144] A Muraguchi, T Hirano, B Tang, T Matsuda, Y Horii, K Nakajima, and T Kishimoto. The essential role of b cell stimulatory factor 2 (bsf-2/il-6) for the terminal differentiation of b cells. *J Exp Med*, 167(2):332–344, Feb 1988.
- [145] Subodh Verma, Shu-Hong Li, Mitesh V Badiwala, Richard D Weisel, Paul W M Fedak, Ren-Ke Li, Bikramjit Dhillon, and Donald A G Mickle. Endothelin antagonism and interleukin-6 inhibition attenuate the proatherogenic effects of c-reactive protein. *Circulation*, 105(16):1890–1896, Apr 2002.
- [146] C D Chung, J Liao, B Liu, X Rao, P Jay, P Berta, and K Shuai. Specific inhibition of stat3 signal transduction by pias3. *Science*, 278(5344):1803–1805, Dec 1997.
- [147] Norihiro Nishimoto and Tadimitsu Kishimoto. Interleukin 6: from bench to bedside. *Nat Clin Pract Rheumatol*, 2(11):619–626, Nov 2006.
- [148] D C Helfgott, L T May, Z Sthoeger, I Tamm, and P B Sehgal. Bacterial lipopolysaccharide (endotoxin) enhances expression and secretion of beta 2 interferon by human fibroblasts. *J Exp Med*, 166(5):1300–1309, Nov 1987.
- [149] T Kishimoto. The biology of interleukin-6. *Blood*, 74(1):1–10, Jul 1989.
- [150] T Taga, Y Kawanishi, R R Hardy, T Hirano, and T Kishimoto. Receptors for b cell stimulatory factor 2. quantitation, specificity, distribution, and regulation of their expression. *J Exp Med*, 166(4):967–981, Oct 1987.
- [151] J V Castell, M J Gomez-Lechon, M David, T Hirano, T Kishimoto, and P C Heinrich. Recombinant human interleukin-6 (il-6/bsf-2/hsf) regulates the synthesis of acute phase proteins in human hepatocytes. *FEBS Lett*, 232(2):347–350, May 1988.
- [152] T Geiger, T Andus, J Klapproth, T Hirano, T Kishimoto, and P C Heinrich. Induction of rat acute-phase proteins by interleukin 6 in vivo. *Eur J Immunol*, 18(5):717–721, May 1988.
- [153] M W Nijsten, E R de Groot, H J ten Duis, H J Klasen, C E Hack, and L A Aarden. Serum levels of interleukin-6 and acute phase responses. *Lancet*, 2(8564):921, Oct 1987.
- [154] T. Kanda and T. Takahashi. Interleukin-6 and cardiovascular diseases. *Japanese heart journal*, 45(2):183–93, 2004.
- [155] N Neu, N R Rose, K W Beisel, A Herskowitz, G Gurri-Glass, and S W Craig. Cardiac myosin induces myocarditis in genetically predisposed mice. *J Immunol*, 139(11):3630–3636, Dec 1987.

- [156] Estelle Bettelli, Yijun Carrier, Wenda Gao, Thomas Korn, Terry B Strom, Mohamed Oukka, Howard L Weiner, and Vijay K Kuchroo. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector th17 and regulatory t cells. *Nature*, 441(7090):235–238, May 2006.
- [157] Paul R Mangan, Laurie E Harrington, Darrell B O’Quinn, Whitney S Helms, Daniel C Bullard, Charles O Elson, Robin D Hatton, Sharon M Wahl, Trenton R Schoeb, and Casey T Weaver. Transforming growth factor-beta induces development of the t(h)17 lineage. *Nature*, 441(7090):231–234, May 2006.
- [158] Xuexian O Yang, Athanasia D Panopoulos, Roza Nurieva, Seon Hee Chang, Demin Wang, Stephanie S Watowich, and Chen Dong. Stat3 regulates cytokine-mediated generation of inflammatory helper t cells. *J Biol Chem*, 282(13):9358–9363, Mar 2007.
- [159] Ivaylo I Ivanov, Brent S McKenzie, Liang Zhou, Carlos E Tadokoro, Alice Lepelley, Juan J Lafaille, Daniel J Cua, and Dan R Littman. The orphan nuclear receptor rorgammata directs the differentiation program of proinflammatory il-17+ t helper cells. *Cell*, 126(6):1121–1133, Sep 2006.
- [160] T Tsutamoto, T Hisanaga, A Wada, K Maeda, M Ohnishi, D Fukai, N Mabuchi, M Sawaki, and M Kinoshita. Interleukin-6 spillover in the peripheral circulation increases with the severity of heart failure, and the high plasma level of interleukin-6 is an important prognostic predictor in patients with congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol*, 31(2):391–398, Feb 1998.
- [161] A C van der Wal, A E Becker, C M van der Loos, and P K Das. Site of intimal rupture or erosion of thrombosed coronary atherosclerotic plaques is characterized by an inflammatory process irrespective of the dominant plaque morphology. *Circulation*, 89(1):36–44, Jan 1994.
- [162] T B Rajavashisth, X P Xu, S Jovinge, S Meisel, X O Xu, N N Chai, M C Fishbein, S Kaul, B Cercek, B Sharifi, and P K Shah. Membrane type 1 matrix metalloproteinase expression in human atherosclerotic plaques: evidence for activation by proinflammatory mediators. *Circulation*, 99(24):3103–3109, Jun 1999.
- [163] L M Biasucci, G Liuzzo, G Fantuzzi, G Caligiuri, A G Rebuffi, F Ginnetti, C A Dinarello, and A Maseri. Increasing levels of interleukin (il)-1ra and il-6 during the first 2 days of hospitalization in unstable angina are associated with increased risk of in-hospital coronary events. *Circulation*, 99(16):2079–2084, Apr 1999.
- [164] R J Raymond, G J Dehmer, T C Theoharides, and E N Deliangyris. Elevated interleukin-6 levels in patients with asymptomatic left ventricular systolic dysfunction. *Am Heart J*, 141(3):435–438, Mar 2001.
- [165] G Plenz, Z F Song, S Reichenberg, T D Tjan, H Robenek, and M C Deng. Left-ventricular expression of interleukin-6 messenger-rna higher in idiopathic dilated than in ischemic cardiomyopathy. *Thorac Cardiovasc Surg*, 46(4):213–216, Aug 1998.
- [166] Georg Baumgarten, Pascal Knuefermann, Dinesh Kalra, Feng Gao, George E Taffet, Lloyd Michael, Perry J Blackshear, Ester Carballo, Natarajan Sivasubramanian, and Douglas L Mann. Load-dependent and -independent regulation of proinflammatory cytokine and cytokine receptor gene expression in the adult mammalian heart. *Circulation*, 105(18):2192–2197, May 2002.
- [167] M C Deng, M Erren, A Lutgen, P Zimmermann, B Brisse, W Schmitz, G Assmann, G Breithardt, and H H Scheld. Interleukin-6 correlates with hemodynamic impairment during dobutamine administration in chronic heart failure. *Int J Cardiol*, 57(2):129–134, Dec 1996.
- [168] H Hirota, K Yoshida, T Kishimoto, and T Taga. Continuous activation of gp130, a signal-transducing receptor component for interleukin 6-related cytokines, causes myocardial hypertrophy in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(11):4862–4866, May 1995.
- [169] K C Wollert, T Taga, M Saito, M Narazaki, T Kishimoto, C C Glembotski, A B Vernallis, J K Heath, D Pennica, W I Wood, and K R Chien. Cardiotrophin-1 activates a distinct form of cardiac muscle cell hypertrophy. assembly of sarcomeric units in series via gp130/leukemia inhibitory factor receptor-dependent pathways. *J Biol Chem*, 271(16):9535–9545, Apr 1996.
- [170] P D Barnes and D W Crook. Culture negative endocarditis. *J Infect*, 35(3):209–213, Nov 1997.
- [171] A R Tunkel and D Kaye. Endocarditis with negative blood cultures. *N Engl J Med*, 326(18):1215–1217, Apr 1992.

- [172] I Rawczynska-Englert, T Hryniewiecki, and D Dzierzanowska. Evaluation of serum cytokine concentrations in patients with infective endocarditis. *J Heart Valve Dis*, 9(5):705–709, Sep 2000.
- [173] Peter Alter, Jutta Hoeschen, Michael Ritter, and Bernhard Maisch. Usefulness of cytokines interleukin-6 and interleukin-2r concentrations in diagnosing active infective endocarditis involving native valves. *Am J Cardiol*, 89(12):1400–1404, Jun 2002.
- [174] T Kanda, S Umeyama, A Sasaki, Y Nakazato, Y Morishita, S Imai, T Suzuki, and K Murata. Interleukin-6 and cardiac myxoma. *Am J Cardiol*, 74(9):965–967, Nov 1994.
- [175] K Reynen. Cardiac myxomas. *N Engl J Med*, 333(24):1610–1617, Dec 1995.
- [176] T Kanda, T Nakajima, H Sakamoto, T Suzuki, and K Murata. An interleukin-6 secreting myxoma in a hypertrophic left ventricle. *Chest*, 105(3):962–963, Mar 1994.
- [177] T Takizawa, H Sumino, T Kanda, I Kobayashi, R Nagai, and S Ichikawa. An interleukin-6-producing cardiac myxoma associated with mediastinal lymphadenopathy. *Cardiology*, 92(4):275–277, 1999.
- [178] T Hirano, T Taga, K Yasukawa, K Nakajima, N Nakano, F Takatsuki, M Shimizu, A Murashima, S Tsunasawa, and F Sakiyama. Human b-cell differentiation factor defined by an anti-peptide antibody and its possible role in autoantibody production. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84(1):228–231, Jan 1987.
- [179] F A Montero-Julian, B Klein, E Gautherot, and H Brailly. Pharmacokinetic study of anti-interleukin-6 (il-6) therapy with monoclonal antibodies: enhancement of il-6 clearance by cocktails of anti-il-6 antibodies. *Blood*, 85(4):917–924, Feb 1995.
- [180] Fabrizio De Benedetti, Hermine I Brunner, Nicolino Ruperto, Andrew Kenwright, Stephen Wright, Inmaculada Calvo, Ruben Cuttica, Angelo Ravelli, Rayfel Schneider, Patricia Woo, Carine Wouters, Ricardo Xavier, Lawrence Zemel, Eileen Baildam, Ruben Burgos-Vargas, Pavla Dolezalova, Stella M Garay, Rosa Merino, Rik Joos, Alexei Grom, Nico Wulffraat, Zbigniew Zuber, Francesco Zulian, Daniel Lovell, and Alberto Martini. Randomized trial of tocilizumab in systemic juvenile idiopathic arthritis. *N Engl J Med*, 367(25):2385–2395, Dec 2012.
- [181] Changhai Ding and Graeme Jones. Technology evaluation: Mra, chugai. *Curr Opin Mol Ther*, 5(1):64–69, Feb 2003.
- [182] Ville Wallenius, Kristina Wallenius, Bo Ahren, Mats Rudling, Hans Carlsten, Suzanne L Dickson, Claes Ohlsson, and John-Olov Jansson. Interleukin-6-deficient mice develop mature-onset obesity. *Nat Med*, 8(1):75–79, Jan 2002.
- [183] J Baan, E T van der Velde, H G de Bruin, G J Smeenk, J Koops, A D van Dijk, D Temmerman, J Senden, and B Buis. Continuous measurement of left ventricular volume in animals and humans by conductance catheter. *Circulation*, 70(5):812–823, Nov 1984.
- [184] Jan Moller Nielsen, Steen B Kristiansen, Steffen Ringgaard, Torsten Toftgaard Nielsen, Allan Flyvbjerg, Andrew N Redington, and Hans Erik Botker. Left ventricular volume measurement in mice by conductance catheter: evaluation and optimization of calibration. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 293(1):H534–40, Jul 2007.
- [185] Pal Pacher, Takahiro Nagayama, Partha Mukhopadhyay, Sandor Batkai, and David A Kass. Measurement of cardiac function using pressure-volume conductance catheter technique in mice and rats. *Nat Protoc*, 3(9):1422–1434, 2008.
- [186] H Matsubara, M Takaki, S Yasuhara, J Araki, and H Suga. Logistic time constant of isovolumic relaxation pressure-time curve in the canine left ventricle. better alternative to exponential time constant. *Circulation*, 92(8):2318–2326, Oct 1995.
- [187] T Boenisch. *Handbuch Immunhistochemische Färbemethoden*, volume 3. Dako Cytomation, Carpinteria, CA, USA, 2003.
- [188] P M Holland, R D Abramson, R Watson, and D H Gelfand. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5′—3′ exonuclease activity of thermus aquaticus dna polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88(16):7276–7280, Aug 1991.
- [189] D Perl, U Mueller, U Heinemann, and F X Schmid. Two exposed amino acid residues confer thermostability on a cold shock protein. *Nat Struct Biol*, 7(5):380–383, May 2000.

- [190] Konstantinos Savvatis, Irene Müller, Matthias Fröhlich, Kathleen Pappritz, Christin Zietsch, Nazha Hamdani, Karsten Grote, Bernhard Schieffer, Karin Klingel, Sophie Van Linthout, Wolfgang A. Linke, Heinz-Peter Schultheiss, and Carsten Tschöpe. Interleukin-6 receptor inhibition modulates the immune reaction and restores titin phosphorylation in experimental myocarditis. *Basic Research in Cardiology*, 109(6), 2014.
- [191] R. Nishio, S. Sasayama, and A. Matsumori. Left ventricular pressure-volume relationship in a murine model of congestive heart failure due to acute viral myocarditis. *J Am Coll Cardiol*, 40(8):1506–14, 2002.
- [192] C. Tschöpe, D. Westermann, P. Steendijk, M. Noutsias, S. Rutschow, A. Weitz, P. L. Schwimmbeck, H. P. Schultheiss, and M. Pauschinger. Hemodynamic characterization of left ventricular function in experimental coxsackieviral myocarditis: effects of carvedilol and metoprolol. *European journal of pharmacology*, 491(2-3):173–9, 2004.
- [193] D. Chen, C. Assad-Kottner, C. Orrego, and G. Torre-Amione. Cytokines and acute heart failure. *Crit Care Med*, 36(1 Suppl):S9–16, 2008.
- [194] D. A. Neumann, J. R. Lane, G. S. Allen, A. Herskowitz, and N. R. Rose. Viral myocarditis leading to cardiomyopathy: do cytokines contribute to pathogenesis? *Clin Immunol Immunopathol*, 68(2):181–90, 1993.
- [195] S. Heymans, E. Hirsch, S. D. Anker, P. Aukrust, J. L. Balligand, J. W. Cohen-Tervaert, H. Drexler, G. Filippatos, S. B. Felix, L. Gullestad, D. Hilfiker-Kleiner, S. Janssens, R. Latini, G. Neubauer, W. J. Paulus, B. Pieske, P. Ponikowski, B. Schroen, H. P. Schultheiss, C. Tschöpe, M. Van Bilsen, F. Zannad, J. McMurray, and A. M. Shah. Inflammation as a therapeutic target in heart failure?: A scientific statement from the translational research committee of the heart failure association of the european society of cardiology. *Eur J Heart Fail*, 11(2):119–29, 2009.
- [196] J R Lane, D A Neumann, A Lafond-Walker, A Herskowitz, and N R Rose. Interleukin 1 or tumor necrosis factor can promote coxsackie b3-induced myocarditis in resistant b10.a mice. *J Exp Med*, 175(4):1123–1129, Apr 1992.
- [197] S A Huber and D Sartini. Roles of tumor necrosis factor alpha (tnf-alpha) and the p55 tnf receptor in cd1d induction and coxsackievirus b3-induced myocarditis. *J Virol*, 79(5):2659–2665, Mar 2005.
- [198] Michael Torzewski, Philip Wenzel, Hartmut Kleinert, Christoph Becker, Jasmin El-Masri, Elena Wiese, Moritz Brandt, Andrea Pautz, Laura Twardowski, Edgar Schmitt, Thomas Munzel, and Kurt Reifenberg. Chronic inflammatory cardiomyopathy of interferon gamma-overexpressing transgenic mice is mediated by tumor necrosis factor-alpha. *Am J Pathol*, 180(1):73–81, Jan 2012.
- [199] Steve Bird, Jun Zou, Tiehui Wang, Barry Munday, Charlie Cunningham, and Chris J Secombes. Evolution of interleukin-1beta. *Cytokine Growth Factor Rev*, 13(6):483–502, Dec 2002.
- [200] M Helle, L Boeije, and L A Aarden. Il-6 is an intermediate in il-1-induced thymocyte proliferation. *J Immunol*, 142(12):4335–4338, Jun 1989.
- [201] Ronen Alon and Sara Feigelson. From rolling to arrest on blood vessels: leukocyte tap dancing on endothelial integrin ligands and chemokines at sub-second contacts. *Semin Immunol*, 14(2):93–104, Apr 2002.
- [202] C L Pummerer, G Grassl, M Sailer, K W Bachmaier, J M Penninger, and N Neu. Cardiac myosin-induced myocarditis: target recognition by autoreactive t cells requires prior activation of cardiac interstitial cells. *Lab Invest*, 74(5):845–852, May 1996.
- [203] D Bulgarini, S Scalzo, G Boccoli, M Petrini, M T Quaranta, A Camagna, G Isacchi, U Testa, and C Peschle. Il-6/bsf-2 selectively stimulates the go—s progression of cd8+ lymphocytes. *J Biol Regul Homeost Agents*, 5(1):23–33, Jan-Mar 1991.
- [204] H R Ford, R A Hoffman, S Wang, and R L Simmons. Induction of cytotoxic t lymphocyte development from murine thymocytes by il-1 and il-6. *J Pediatr Surg*, 26(4):397–400, Apr 1991.
- [205] H Z Bass, N Yamashita, and L T Clement. Heterogeneous mechanisms of human cytotoxic t lymphocyte generation. ii. differential effects of il-6 on the helper cell-independent generation of ctl from cd8+ precursor subpopulations. *J Immunol*, 151(6):2895–2903, Sep 1993.

- [206] I. Kindermann, M. Kindermann, R. Kandolf, K. Klingel, B. Bultmann, T. Muller, A. Lindinger, and M. Bohm. Predictors of outcome in patients with suspected myocarditis. *Circulation*, 118(6):639–48, 2008.
- [207] Marc Veldhoen, Richard J Hocking, Christopher J Atkins, Richard M Locksley, and Brigitta Stockinger. Tgfbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of il-17-producing t cells. *Immunity*, 24(2):179–189, Feb 2006.
- [208] Brent S McKenzie, Robert A Kastelein, and Daniel J Cua. Understanding the il-23-il-17 immune pathway. *Trends Immunol*, 27(1):17–23, Jan 2006.
- [209] Jing Yuan, Miao Yu, Qiong-Wen Lin, Ai-Lin Cao, Xian Yu, Ji-Hua Dong, Jin-Ping Wang, Jing-Hui Zhang, Min Wang, He-Ping Guo, Xiang Cheng, and Yu-Hua Liao. Th17 cells contribute to viral replication in coxsackievirus b3-induced acute viral myocarditis. *J Immunol*, 185(7):4004–4010, Oct 2010.
- [210] Fan Yang, Wei-Feng Wu, Yu-Luan Yan, Yu Pang, Qing Kong, and Yan-Lan Huang. Expression of il-23/th17 pathway in a murine model of coxsackie virus b3-induced viral myocarditis. *Virol J*, 8:301, 2011.
- [211] Petra Roll, Khalid Muhammad, Mathias Schumann, Stefan Kleinert, Hermann Einsele, Thomas Dornier, and Hans-Peter Tony. In vivo effects of the anti-interleukin-6 receptor inhibitor tocilizumab on the b cell compartment. *Arthritis Rheum*, 63(5):1255–1264, May 2011.
- [212] Peter C Heinrich, Iris Behrmann, Serge Haan, Heike M Hermanns, Gerhard Muller-Newen, and Fred Schaper. Principles of interleukin (il)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J*, 374(Pt 1):1–20, Aug 2003.
- [213] Weili Zhang, Amanda L Chancey, Huei-Ping Tzeng, Zhenqing Zhou, Kory J Lavine, Feng Gao, Natarajan Sivasubramanian, Philip M Barger, and Douglas L Mann. The development of myocardial fibrosis in transgenic mice with targeted overexpression of tumor necrosis factor requires mast cell-fibroblast interactions. *Circulation*, 124(19):2106–2116, Nov 2011.
- [214] Konstantinos Savvatis, Sophie van Linthout, Kapka Miteva, Kathleen Pappritz, Dirk Westermann, Joerg C Schefold, Gerhard Fusch, Alice Weithauser, Ursula Rauch, Peter-Moritz Becher, Karin Klingel, Jochen Ringe, Andreas Kurtz, Heinz-Peter Schultheiss, and Carsten Tschöpe. Mesenchymal stromal cells but not cardiac fibroblasts exert beneficial systemic immunomodulatory effects in experimental myocarditis. *PLoS One*, 7(7):e41047, 2012.
- [215] Miao Yu, Jun Hu, Ming-Xin Zhu, Tong Zhao, Wei Liang, Shuang Wen, Huan-Huan Li, Qi Long, Min Wang, He-Ping Guo, Xiang Cheng, Yu-Hua Liao, and Jing Yuan. Cardiac fibroblasts recruit th17 cells infiltration into myocardium by secreting ccl20 in cvb3-induced acute viral myocarditis. *Cell Physiol Biochem*, 32(5):1437–1450, 2013.
- [216] Xiangde Liu, Anuk M Das, Jonathan Seideman, Don Griswold, Chantal N Afuh, Tetsu Kobayashi, Shinji Abe, Qiuhong Fang, Mitsu Hashimoto, Huijung Kim, Xingqi Wang, Lei Shen, Shin Kawasaki, and Stephen I Rennard. The cc chemokine ligand 2 (ccl2) mediates fibroblast survival through il-6. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 37(1):121–128, Jul 2007.
- [217] Feifei Ma, Yulin Li, Lixin Jia, Yalei Han, Jizhong Cheng, Huihua Li, Yongfen Qi, and Jie Du. Macrophage-stimulated cardiac fibroblast production of il-6 is essential for tgfbeta/smad activation and cardiac fibrosis induced by angiotensin ii. *PLoS One*, 7(5):e35144, 2012.
- [218] A Henke, H Launhardt, K Klement, A Stelzner, R Zell, and T Munder. Apoptosis in coxsackievirus b3-caused diseases: interaction between the capsid protein vp2 and the proapoptotic protein siva. *J Virol*, 74(9):4284–4290, May 2000.
- [219] Toshitaka Yajima, Hideo Yasukawa, Eun-Seok Jeon, Dingding Xiong, Andrea Dornier, Mitsuo Iwatake, Miwako Nara, Hanbing Zhou, Daphne Summers-Torres, Masahiko Hoshijima, Kenneth R Chien, Akihiko Yoshimura, and Kirk U Knowlton. Innate defense mechanism against virus infection within the cardiac myocyte requiring gp130-stat3 signaling. *Circulation*, 114(22):2364–2373, Nov 2006.
- [220] Mirna Mourtada-Maarabouni, Lucy Kirkham, Farzin Farzaneh, and Gwyn T Williams. Functional expression cloning reveals a central role for the receptor for activated protein kinase c 1 (rack1) in t cell apoptosis. *J Leukoc Biol*, 78(2):503–514, Aug 2005.

- [221] M. A. Watsky, K. T. Weber, Y. Sun, and A. Postlethwaite. New insights into the mechanism of fibroblast to myofibroblast transformation and associated pathologies. *Int Rev Cell Mol Biol*, 282:165–92, 0.
- [222] Dirk Westermann, Diana Lindner, Mario Kasner, Christine Zietsch, K Savvatis, F Escher, J von Schlippenbach, C Skurk, Paul Steendijk, Alexander Riad, Wolfgang Poller, Heinz-Peter Schultheiss, and Carsten Tschöpe. Cardiac inflammation contributes to changes in the extracellular matrix in patients with heart failure and normal ejection fraction. *Circ Heart Fail*, 4(1):44–52, Jan 2011.
- [223] A. Leask. Potential therapeutic targets for cardiac fibrosis: Tgfbeta, angiotensin, endothelin, ccn2, and pdgf, partners in fibroblast activation. *Circ Res*, 106(11):1675–80, Jun 0.
- [224] L. Hammoud, X. Lu, M. Lei, and Q. Feng. Deficiency in timp-3 increases cardiac rupture and mortality post-myocardial infarction via egfr signaling: beneficial effects of cetuximab. *Basic research in cardiology*, 2011.
- [225] S Heymans, A Luttun, D Nuyens, G Theilmeier, E Creemers, L Moons, G D Dyspersin, J P Cleutjens, M Shipley, A Angellilo, M Levi, O Nube, A Baker, E Keshet, F Lupu, J M Herbert, J F Smits, S D Shapiro, M Baes, M Borgers, D Collen, M J Daemen, and P Carmeliet. Inhibition of plasminogen activators or matrix metalloproteinases prevents cardiac rupture but impairs therapeutic angiogenesis and causes cardiac failure. *Nat Med*, 5(10):1135–1142, Oct 1999.
- [226] Stephane Heymans, Florea Lupu, Sven Terclavers, Bjorn Vanwetswinkel, Jean-Marc Herbert, Andrew Baker, Desire Collen, Peter Carmeliet, and Lieve Moons. Loss or inhibition of upa or mmp-9 attenuates lv remodeling and dysfunction after acute pressure overload in mice. *Am J Pathol*, 166(1):15–25, Jan 2005.
- [227] Shin-ichiro Matsumura, Shiro Iwanaga, Satsuki Mochizuki, Hiroyuki Okamoto, Satoshi Ogawa, and Yasunori Okada. Targeted deletion or pharmacological inhibition of mmp-2 prevents cardiac rupture after myocardial infarction in mice. *J Clin Invest*, 115(3):599–609, Mar 2005.
- [228] Vijay Kandalam, Ratnadeep Basu, Thomas Abraham, Xiuhua Wang, Paul D Soloway, Diane M Jaworski, Gavin Y Oudit, and Zamaneh Kassiri. Timp2 deficiency accelerates adverse post-myocardial infarction remodeling because of enhanced mt1-mmp activity despite lack of mmp2 activation. *Circ Res*, 106(4):796–808, Mar 2010.
- [229] Merry L Lindsey and Thomas K Borg. Understanding the role of the extracellular matrix in cardiovascular development and disease: where do we go from here? *J Mol Cell Cardiol*, 48(3):431–432, Mar 2010.
- [230] Rama Khokha, Aditya Murthy, and Ashley Weiss. Metalloproteinases and their natural inhibitors in inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol*, 13(9):649–665, Sep 2013.
- [231] I Hashimoto. Myocarditis in mice infected with coxsackie virus b3. *Br J Exp Pathol*, 67(5):737–745, Oct 1986.
- [232] Felicitas Escher, Dirk Westermann, Regina Gaub, Johannes Pronk, Thomas Bock, Nidal Al-Saadi, Uwe Kuhl, Heinz-Peter Schultheiss, and Carsten Tschöpe. Development of diastolic heart failure in a 6-year follow-up study in patients after acute myocarditis. *Heart*, 97(9):709–714, May 2011.
- [233] Casper Eurlings and Stephane Heymans. Diastolic heart failure after acute myocarditis, a new discovery in inflammatory cardiomyopathies? *Heart*, 97(9):685–686, May 2011.
- [234] D A Kass, J M Hare, and D Georgakopoulos. Murine cardiac function: a cautionary tail. *Circ Res*, 82(4):519–522, Mar 1998.
- [235] Eva M Staal, Jan Baan, J Wouter Jukema, Ernst E van der Wall, and Paul Steendijk. Assessment of parallel conductance for the trans-cardiac conductance method: can we use the hypertonic saline method with pulmonary artery injections? *Physiol Meas*, 25(2):565–576, Apr 2004.
- [236] S. Joho, S. Ishizaka, R. Sievers, E. Foster, P. C. Simpson, and W. Grossman. Left ventricular pressure-volume relationship in conscious mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 292(1):H369–77, 2007.

Abbildungsverzeichnis

1	Einfluss von IL-6 auf die angeborene und erworbene Immunität	12
2	Differenzierung der T _H -Zell-Population	13
3	IL-6 Rezeptorsysteme	18
4	IL-6 Feedbackmechanismus	19
5	Mögliche Einsatzgebiete einer IL-6 Blockade	24
6	PV-Kurven einer gesunden Maus in Ruhe und bei Vorlastreduktion	30
7	Schema der ABC und EnVision-Methode	36
8	HE-Färbung und Myokarditis Score	55
9	Färbung IL-6	56
10	Kardiale Zytokinexpression	58
11	Färbung ICAM	59
12	Färbung CD3 ⁺ -Zellen	61
13	Färbung CD8 ⁺ -Zellen	62
14	Färbung CD68 ⁺ -Zellen	63
15	Färbung CD80 ⁺ -Zellen	64
16	Frühe T-Zell Reaktion	66
17	Färbung RACK	68
18	Färbung TUNEL	69
19	Färbung α -SMA	70
20	Färbung Kollagen I	71
21	Färbung Kollagen III	72
22	Färbung MMP-2	73
23	Färbung MMP-9	74
24	CVB3-Infektion bei Fibroblasten, Kardiomyozyten und Monozyten	78
25	Zytokinexpression nach CVB3-Infektion	79
26	Zytokinexpression nach Stimulation mit 10 ng IL-6	80

Tabellenverzeichnis

1	Ursachen von Myokarditiden	5
2	Klinisch pathologische Einteilung der Myokarditiden	7
3	Unterteilung der Matrixmetalloproteinasen	16
4	IL-6 produzierende Zellen	20
5	Das Gruppendesign der verwendeten Tiere	26
6	Verfahren der HE-Färbemethode	34
7	Verwendete Antikörper für die Immunhistochemie	37
8	Protokoll der ABC-Methode	39
9	Protokoll der EnVision TM -Methode	41
10	Protokoll der DeadEnd TM Colorimetric TUNEL-Methode	43
11	Zusammensetzung des RT-Mastermix	45
12	Verwendete Gen Expression Assays der Firma ABI für die TaqMan [®] PCR .	47
13	Verwendete Verbrauchsmaterialien	49
14	Verwendete Laborgeräte	50
15	Verwendete Puffer und Chemikalien	51
16	Gewichtsangaben	53
17	Hämodynamische Parameter	76

Lebenslauf

Aus Gründen des Datenschutzes wird auf die Veröffentlichung des Lebenslaufes in der elektronischen Version der Arbeit verzichtet.

Publikationen

Peter Moritz Becher, Diana Lindner, Matthias Fröhlich, Kostantinos Savvatis, Dirk Westermann and Carsten Tschöpe

Assessment of cardiac inflammation and remodeling during the development of streptozotocin-induced diabetic cardiomyopathy in vivo: A time course analysis.

Int J Mol Med. 2013 Jul;32(1):158-64. doi: 10.3892/ijmm.2013.1368.

Dirk Westermann, Peter Moritz Becher, Diana Lindner, Kostantinos Savvatis, Yu Xia, Matthias Fröhlich, Sebastian Hoffmann, Heinz-Peter Schultheiss, Carsten Tschöpe

Selective PDE5A inhibition with sildenafil rescues left ventricular dysfunction, inflammatory immune response and cardiac remodeling in angiotensin II-induced heart failure in vivo

Basic Res Cardiol. 2012 Nov;107(6):308. doi: 10.1007/s00395-012-0308-y. Epub 2012 Nov 2

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht in

Konstantinos Savvatis, Irene Müller, Matthias Fröhlich, Kathleen Pappritz, Nazha Hamdani, Karsten Grote, Bernhard Schieffer, Karin Klingel, Sophie Van Linthout, Wolfgang A. Linke, Heinz-Peter Schultheiss, Carsten Tschöpe

Interleukin-6 receptor inhibition modulates the immune reaction and restores titin phosphorylation in experimental myocarditis

Basic Res Cardiol. 2014 Oct;109:449. doi: 10.1007/s00395-014-0449-2. Epub 2014 Oct 25

Anteilserklärung an erfolgten Publikationen

Peter Moritz Becher, Diana Lindner, Matthias Fröhlich, Kostantinos Savvatis, Dirk Westermann and Carsten Tschöpe

Assessment of cardiac inflammation and remodeling during the development of streptozotocin-induced diabetic cardiomyopathy in vivo: A time course analysis.

Int J Mol Med. 2013 Jul;32(1):158-64. doi: 10.3892/ijmm.2013.1368.

Anteil im Einzelnen:

- Durchführung des Tierversuchs (Diabetesinduktion)
- Datenerhebung (Hämodynamische Charakterisierung)
- Datenauswertung (Hämodynamische Funktion)

Dirk Westermann, Peter Moritz Becher, Diana Lindner, Kostantinos Savvatis, Yu Xia, Matthias Fröhlich, Sebastian Hoffmann, Heinz-Peter Schultheiss, Carsten Tschöpe

Selective PDE5A inhibition with sildenafil rescues left ventricular dysfunction, inflammatory immune response and cardiac remodeling in angiotensin II-induced heart failure in vivo

Basic Res Cardiol. 2012 Nov;107(6):308. doi: 10.1007/s00395-012-0308-y. Epub 2012 Nov 2

Anteil im Einzelnen:

- Durchführung des Tierversuchs (Induktion einer kardialen Hypertrophie)
- Datenerhebung (Hämodynamische Charakterisierung)
- Datenauswertung (Hämodynamische Funktion)
- Manuskriptdurchsicht

Konstantinos Savvatis, Irene Müller, Matthias Fröhlich, Kathleen Pappritz, Nazha Hamdani, Karsten Grote, Bernhard Schieffer, Karin Klingel, Sophie Van Linthout, Wolfgang A. Linke, Heinz-Peter Schultheiss, Carsten Tschöpe

Interleukin-6 receptor inhibition modulates the immune reaction and restores titin phosphorylation in experimental myocarditis

Basic Res Cardiol. 2014 Oct;109:449. doi: 10.1007/s00395-014-0449-2. Epub 2014 Oct 25

Anteil im Einzelnen:

- Durchführung des Tierversuchs (Infektion, IL-6 Rezeptorblockade)
- Datenerhebung (Hämodynamische Charakterisierung, Immunhistologie, Genexpression)
- Datenauswertung (Hämodynamische Funktion, Immunhistologie, Genexpression)
- Manuskripterstellung
- Manuskriptdurchsicht

Matthias Fröhlich, Berlin im November 2014

Erklärung an Eides statt

Ich, Matthias Fröhlich, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: *“Der Einfluss der Interleukin-6 Rezeptorblockade auf die virale Myokarditis im murinen Tiermodell”* 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 Betreuer, 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.

Matthias Fröhlich, Berlin im November 2014

Danksagung

Mein vorderster Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. C. Tschöpe für die freundliche Überlassung des Themas und die stets gute Betreuung, während meiner experimentellen Arbeit in seinen Laboren. Herrn Prof. Dr. med H.-P. Schultheiss danke ich dafür, dass er mir die Möglichkeit gab, an seinem Institut zu dieser Promotion zu forschen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. med. K. Savvatis und Herrn Dr. med. P.M. Becher, die in allen Belangen des wissenschaftlichen Arbeitens stets ein offenes Ohr für mich hatten. Beide haben mich immer wieder motiviert auch in schwierigen Phasen der Arbeit nicht aufzugeben und waren zu jeder Zeit bereit, theoretische Probleme zielführend zu diskutieren und auch bei praktischen Schwierigkeiten Hilfestellung zu leisten. Frau Dr. rer. nat. D. Lindner und Herrn Dr. med. K. Savvatis danke ich insbesondere für die schnelle und konstruktive Korrektur meines Manuskriptes. Des weiteren bedanke ich mich bei Herrn PD Dr. med. D. Westermann für die Unterstützung in wissenschaftlichen Fragestellungen und Bereitschaft zur Problemdiskussion. Für ihre Unterstützung bei den Arbeiten in Zellkultur gilt mein Dank Frau Dipl. Biol. Irene Müller. Für die freundliche Arbeitsatmosphäre bedanke ich mich bei K. Puhl, G. Zingler und M. Pippow die mich mit Geduld und Hilfsbereitschaft in die Laborarbeit eingeführt haben.

Von ganzem Herzen bedanke ich mich bei meinen Eltern für die immerwährende Motivation und Unterstützung. Ohne sie hätte ich das Medizinstudium und diese Dissertation nicht absolvieren können. Der größte Dank gilt meiner Frau Catarina und meiner Tochter Anna Charlotte für ihre Geduld und ihr Verständnis in der Zeit meiner wissenschaftlichen Arbeit. Ohne den Rückhalt und die Aufopferung dieser beiden Menschen und der Bereitschaft zum Verzicht in vielen Belangen, wäre die Fertigstellung dieser Arbeit nicht möglich gewesen.

Matthias Fröhlich, Berlin im November 2014