

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I
Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Steffen Massberg

Die Bedeutung der VCAM-1/VLA4-Achse im Rahmen der Autoimmunmyokarditis

DISSERTATION

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Johanna Becker, geb. Grabmeier

aus Schwabach

2019

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Stefan Brunner

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Martin Kerschensteiner
PD Dr. Albrecht von Brunn

Mitbetreuung durch
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Ulrich Grabmaier

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 24.01.2019

Eidesstattliche Versicherung

Johanna Becker

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Die Bedeutung der VCAM-1/VLA-4 Achse im Rahmen der Autoimmunmyokarditis

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, den 08.03.2019

Johanna Becker

Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung	1
1.1. Klinische Hintergründe der Myokarditis.....	1
1.1.1. Die verschiedenen Formen der Myokarditis.....	1
1.1.2. Klinische Präsentation und Diagnose der Myokarditis.....	3
1.1.3. Die Therapieoptionen der Myokarditis.....	5
1.1.4. Prognose der Myokarditis.....	6
1.2. Die Pathophysiologie der Myokarditis.....	7
1.3. Die Bedeutung der Autoimmunität bei der Entwicklung einer Myokarditis.....	9
1.4. Die Myokarditis im Mausmodell.....	9
1.4.1. Der zeitliche Verlauf der Experimentellen Autoimmunmyokarditis	10
1.4.2. Zelluläre Komponenten der kardialen Entzündung.....	12
1.5. Die VCAM-1/VLA-4-Achse und ihre Bedeutung bei der Entzündungsentstehung.....	12
1.5.1. Das lösliche sVCAM-1.....	14
2. Fragestellung	16
3. Material und Methoden	17
3.1. Versuchstiere.....	17
3.1.1. Gesetzliche Rahmenbedingungen.....	17
3.1.2. Eingesetzte Versuchstiere.....	17
3.1.3. Haltungsbedingungen.....	17
3.2. Material.....	18
3.2.1. Allgemeine Chemikalien und Lösungsmittel.....	18
3.2.2. Materialien für Protein-Methoden.....	18
3.2.3. Materialien für die Immunisierung.....	18
3.2.4. Antikörper.....	18
3.2.5. Pharmaka.....	19
3.2.6. Histologie/Färbungen.....	19
3.2.7. Operationszubehör.....	19
3.2.8. Material für die PET-Untersuchung.....	20
3.2.9. Geräte und sonstige Materialien.....	20
3.2.10. Hard-und Software.....	21
3.3. Methoden.....	21

3.3.1. Versuchsdesign	21
3.3.2. Der VLA-4-Antikörper Natalizumab.....	22
3.3.3. Versuchsdesign der Antikörpertherapie.....	23
3.3.4. Immunisierung mit dem myc- α Protein	24
3.3.4.1 Herstellung der autoreaktiven Substanz.....	24
3.3.4.2 Immunsierung der Mäuse.....	25
3.3.5. Gewebegewinnung.....	25
3.3.5.1 Herzentnahme.....	25
3.3.5.2 Blutentnahme	25
3.3.6. Histologische Untersuchungen	26
3.3.7. Färbungen	26
3.3.7.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	26
3.3.7.2 Masson-Trichromfärbung.....	26
3.3.8. EAM-Score	27
3.3.9. Quantitative Fibroseauswertung	27
3.3.10. Durchflusszytometrie (Fluorescence Activated Cell Sorting, FACS).....	28
3.3.10.1 Prinzip der FACS-Analyse.....	28
3.3.10.2 Probenvorbereitung und Messung.....	29
3.3.11. Prinzip des ELISA	31
3.3.11.1 Probengewinnung und Messung	31
3.3.12. PET (Positronen-Emissions-Tomographie).....	32
3.3.12.1 Prinzip der PET Messung.....	32
3.3.12.2 Vorbereitung und Durchführung der Messung	34
3.3.13. Murine Normwerte der Herzfunktionsparameter	34
3.3.14. Bestimmung der murinen Körper-und Herzgewichte im zeitlichen Verlauf	35
3.3.15. Statistische Analyse	35
4. Ergebnisse	36
4.1. Evaluation der kardialen Infiltration mittels Histologie	36
4.2. Quantifizierung der kardialen Infiltration spezifischer Subpopulationen mittels FACS	37
4.2.1. Migration von VLA-4+ Zellen im zeitlichen Verlauf	37
4.2.2. Migration von CD45 ⁺ /CD4 ⁺ T-Helferzellen im zeitlichen Verlauf der EAM	38

4.2.3.	Migration von T-regulatorischen Zellen im zeitlichen Verlauf der EAM.....	38
4.2.4.	Migration von CD45+/Prominin-1+ Progenitorzellen.....	38
4.3.	Aktivierung der VCAM-1/VLA-4-Achse	39
4.3.1.	Quantifizierung des kardialen VCAM-1.....	39
4.3.2.	Quantifizierung der murinen sVCAM-1-Plasmalevel	40
4.3.3.	Fehlende Korrelation der sVCAM-1 Plasmalevel mit dem Grad der kardialen Leukozyteninfiltration an Tag 21	41
4.4.	Histologische Evaluation der Inflammation nach VLA-4-Antikörpergabe. 42	
4.4.1.	Evaluation der sVCAM-1-Plasmaspiegel nach VLA-4-Antikörpergabe	42
4.4.2.	Evaluation der myokardialen Inflammation mittels FACS nach VLA-4-Antikörpergabe	43
4.5.	Auswirkung des VLA-4-Antikörpers auf die kardiale Fibrose im Rahmen der EAM	46
4.6.	PET-Untersuchung der Herzfunktion von EAM-Mäusen.....	48
4.6.1.	Bestimmung der Herzfunktionsparameter nach Antikörperintervention im akutem Stadium der EAM	48
4.6.1.1	Ausbleibende Reduktion der Ejektionsfraktion im chronischen Stadium nach Antikörperintervention im akutem Stadium.....	48
4.6.1.2	Bestimmung von EDV und ESV im chronischen Stadium nach Antikörperintervention im akutem Stadium der EAM.....	49
4.6.2.	Korrelation der sVCAM-1-Level mit der kardialen Herzfunktion im chronischen Stadium der EAM.....	50
5.	Diskussion	51
5.1.	Die Aktivierung der VCAM-1/VLA-4-Achse bei der EAM.....	51
5.2.	Infiltration von Leukozytensubpopulationen.....	53
5.3.	Der VLA-4-Antikörper als neuer therapeutischer Ansatz der EAM.....	55
5.4.	Reduktion der Progression der EAM zur iDCM nach Gabe eines VLA-4-Antikörpers	57
5.5.	Limitationen der Arbeit	61
6.	Zusammenfassung.....	63

7. Literaturverzeichnis.....	65
Abbildungsverzeichnis.....	81
Tabellenverzeichnis.....	83
Abkürzungsverzeichnis.....	84

1. EINLEITUNG

1.1. Klinische Hintergründe der Myokarditis

Die WHO definiert die Myokarditis als entzündliche Erkrankung des Herzmuskelgewebes [1]. Kommt es im Rahmen der Entzündung darüber hinaus zu einer kardialen Dysfunktion spricht man von einer inflammatorischen dilatativen Kardiomyopathie (iDCM) [2-4]. In Folge einer akuten Myokarditis entwickeln bis zu 30% der Patienten eine iDCM [4]. Die Myokarditis gehört somit weltweit zu den wichtigsten Ursachen für die Entwicklung einer dilatativen Kardiomyopathie (DCM), die wiederum durch die Dilatation des linken Ventrikels in Kombination mit einer kardialen Dysfunktion definiert ist [5, 6]. Die DCM ist aktuell einer der häufigsten Indikationen für eine Herztransplantation und post mortem erhobene Daten zeigen, dass bei 8,6%-12% junger Erwachsener mit plötzlichem Herztod eine Myokarditis nachgewiesen werden kann [7-9]. Als diagnostischer Goldstandard der Herzmuskelentzündung ist nach wie vor die Myokardbiopsie festgelegt [1, 5]. Hierbei kann histopathologisch die Diagnose Myokarditis bei einem Nachweis von mehr als 14 Leukozyten (CD3+ T-Zellen sowie CD68+ Makrophagen) pro mm² gestellt werden [10]. Nicht selten wird die Entzündung des Herzmuskels mit einer Virusinfektion oder einer postviralen Immunantwort in Verbindung gebracht, sie kann sich aber auch idiopathisch, toxisch oder als reine Autoimmunerkrankung darstellen [11]. Klinisch zeigt sich eine große Symptomvariabilität von nahezu asymptomatischen Patienten bis hin zum akuten Herzversagen [12]. Bei nicht abschließend geklärter Pathophysiologie und unzureichenden Therapieoptionen stellen sowohl die akute Myokarditis als auch die inflammatorische Kardiomyopathie nach wie vor eine große Herausforderung in Diagnose und Behandlung dar.

1.1.1. Die verschiedenen Formen der Myokarditis

Der Begriff Myokarditis ist eine Sammelbezeichnung für eine entzündliche Erkrankung des Herzmuskels und vereint unterschiedlichste Ätiologien in sich. Die virale Infektion und ihre postinfektiöse Immunreaktion stellen dabei die häufigste Ursache der Myokarditis in westlichen Industrienationen dar. Humanpathogene Viren, vor allem Enteroviren, wie z.B. Coxsackieviren, und Adenoviren werden häufig mit der Entstehung einer Herzmuskelentzündung assoziiert. Aber auch der humane Herpesvirus 6 (HHV6) und Parvovirus B19 wurden zuletzt vermehrt nachgewiesen [10]. Darüber hinaus gibt es ebenfalls zahlreiche nicht virale Infektionen als Ursache der Myokarditis. Hier werden vor allem in Entwicklungsländern bakterielle Erreger wie z.B. Chlamydien und Mycobacterium

tuberculosis, Pilze, Spirochäten, Protozoen und Parasiten beschrieben. Besonders hervorzuheben ist hier die Chagas Krankheit, welche durch eine Infektion mit dem Erreger *Trypanosoma cruzi* entsteht und eine der häufigsten Ursachen für eine myokardiale Entzündung in Lateinamerika ist [13].

Eine Myokarditis kann aber auch durch verschiedenste nicht-infektiöse Ursachen entstehen. Hierzu zählen Autoimmunerkrankungen, wie die Rheumatoide Arthritis, die Sarkoidose, die Psoriasis oder der systemische Lupus erythematoses (SLE). Zu den autoimmunvermittelten Myokarditiden gehören ebenfalls die Riesenzellmyokarditis und die eosinophile Myokarditis, welche sich durch einen besonderen Verlauf auszeichnen [14, 15]. Letztere kann im Rahmen eines hypereosinophilen Syndromes (HES) oder nach Medikamentenexposition im Rahmen eines DRESS-Syndroms auftreten. Auch bei der oben genannten Chagas Erkrankung spielt eine autoimmune Komponente eine entscheidende Rolle bei der Entstehung der Myokarditis [13].

Abhängig von ihrem Aktivitätsstadium lassen sich die Myokarditiden klinisch-pathologisch in eine in eine fulminante, eine aktive, eine chronisch-aktive und eine chronisch persistierende Form unterteilen [14].

Tabelle 1-1: Myokarditisätiologie, modifiziert nach [12]

Infektiöse Ursachen	Nicht-infektiöse Ursachen
<p>RNA-Viren: Picornavirus (Cocksackie A+B, ECHO-Virus, Poliovirus, Hepatitisvirus), Orthomyxovirus (Influenza), Paramyxovirus (Mumps), Togavirus (Rubella), Flavivirus (Denguefieber, Gelbfieber)</p> <p>DNA-Viren: Adenovirus, Parvovirus (B19), Herpesvirus (Humanes Herpesvirus 6, Cytomegalievirus, Epstein-Barr-Virus, Varizella-Zoster-Virus), Retrovirus (HIV)</p> <p>Bakterien: Chlamydien (<i>C. pneumonia/psittaci</i>), <i>Hämophilus influenza</i>, Legionellen, Brucellen, <i>Francisella tularensis</i>, <i>Neisseria meningitis</i>, Mykobakterium tuberculosis, Salmonellen, Staphylokokken, A-Streptokokken, <i>S. pneumonia</i>, tuleramia, tetanus, Syphilis, <i>Vibrio cholera</i></p> <p>Spirochäten: <i>Borrelia recurrentis</i>, <i>Leptospira</i>, <i>Treponema pallidum</i></p> <p>Reckettsien: <i>Coxiella burnetti</i>, <i>R. rickettsii/prowazekii</i></p> <p>Fungi: <i>Aktinomyces</i>, <i>Aspergillus</i>, <i>Candida</i>; <i>Cryptococcus</i>, <i>Histoplasma capsulatum</i>, <i>Nocardia</i></p> <p>Protozoen: <i>Entamoeba histolytica</i>, <i>Leishmania</i>, <i>Plasmodium falciparum</i>, <i>Trypanosoma cruzi</i>, <i>Trypanosoma brucei</i>, <i>Toxoplasma gondii</i></p> <p>Helmini: <i>Ascaris lumbricoides</i>, <i>Echinococcus granulosus</i>, <i>Schistosoma</i>, <i>Trichinella spiralis</i>, <i>Wuchereria bancrofti</i></p>	<p>Autoimmunerkrankungen: Dermatomyositis, Morbus Chron, Rheumatoide Arthritis, Sjögren Syndrom, Systemischer Lupus erythematoses, Wegner Granulomatose, Riesenzellmyokarditis</p> <p>Medikamentös-toxisch: Aminophyllin, Amphetamine, Anthracyclin, Katecholamine, Chloramphenicol, Cyclophosphamid, Doxorubicin, 5-Floururacil, Phenytoin, Trastuzumab, Zidovudine, Kokain</p> <p>Medikamentös-allergisch: Azitromycin, Benzodiazepine, Clozapin, Cephalosporine, Dapson, Dobutamin, Litjum, Diuretika, Thiazide, Methyldopa, Streptomycin, Sulfonamide, Nicht-steroidale Antiphlogistika, Tetracycline, Trizyklische Antidepressiva</p> <p>Systemische Erkrankungen: Churg-Strauss-Syndrom, Kollagenosen, Sarkoidose, Kawasaki Syndrom, Sklerodermie</p> <p>Andere: Herzinfarkt, Hypothermie, Transplantatabstoßung, Bestrahlung</p>

1.1.2. Klinische Präsentation und Diagnose der Myokarditis

Dem heterogenen Bild der Myokarditis entsprechend stellt sich auch ihre klinische Präsentation dar. Das Spektrum reicht von völlig asymptomatischen Patienten mit auffälligen echokardiographischen Befunden über Patienten mit Herzinfarkt ähnlichen Beschwerden wie Angina Pectoris, Palpitationen und kardialen Arrhythmien bis hin zu plötzlich eintretenden Herzinsuffizienz und Herzversagen [3, 10, 16]. Dyspnoe, Orthopnoe und verminderte körperliche Belastbarkeit können ebenfalls Zeichen einer Myokarditis darstellen

[17]. Virale Infekte des Respirations- oder Gastrointestinaltraktes mit unspezifischen Symptomen, wie Fieber und Abgeschlagenheit, können einer Myokarditis vorrausgehen, sind aber nicht pathognomonisch [12, 17].

Aufgrund dieser heterogenen Präsentation, eines häufig subklinisch verlaufenden Progresses der Myokarddysfunktion sowie einer damit verbunden verspäteten Erstvorstellung beim behandelnden Kardiologen ist eine frühzeitige klinische Diagnosestellung erschwert [10].

Als Hilfsmittel dienen Elektrokardiogramm (EKG), Echokardiographie, Magnetresonanztomographie und Herzkatheter, um die Auswirkungen der Entzündung auf die Myokardfunktion zu erfassen. Ein Rückschluss auf Ätiologie oder Aktivierungsgrad der Entzündung ist aber kaum möglich. Im EKG zeigen sich häufig myokardinfarktähnliche Veränderungen. Ebenfalls können Arrhythmien und Erregungsleitungsstörungen auftreten [18]. Echokardiographisch lassen sich vor allem andere Ursachen einer Herzfunktionseinschränkung wie Klappendefekte oder andere Kardiomyopathien ausschließen. Mit dieser nicht invasiven Methode konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass Patienten im Stadium einer fulminanten Myokarditis nach einem anfänglichen Myokardödem oft normal große Herzkammern mit einem verdicktem Septum aufweisen, Patienten mit einer akuten Myokarditis eher eine Dilatation des linken Ventrikels und normalen Wanddicken [19]. Zunehmend an Bedeutung als nicht invasive Methode hat die kardiale Magnetresonanztomographie (cMRI) gewonnen [20, 21]. Das cMRI ist sowohl in der Lage qualitativ Herzmuskelgewebe zu charakterisieren als auch gleichzeitig eine Aussage über Funktion und Morphologie zu treffen [22]. Assomull et al. konnte darüber hinaus zeigen, dass bei Patienten mit Thoraxschmerzen, erhöhten Troponin-Werten, aber unauffälligen Koronararterien mit Hilfe des cMRI in bis zu 30% der Fälle eine Myokarditis detektiert werden konnte [23].

Zur endgültigen Diagnosesicherung bleibt jedoch die Myokardbiopsie weiterhin als Goldstandard bestehen. Sie dient dazu die zugrundeliegende Ätiologie der Entzündung festzulegen, um somit eine Grundlage für Therapie und Prognose herzustellen [4]. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass durch eine Erweiterung der histologischen Dallas-Kriterien mit neuen immunhistochemischen Methoden die Sensitivität weiter verbessert werden kann [24, 25]. Allerdings wird die Biopsie als invasives Verfahren in der klinischen Routine eher zurückhaltend eingesetzt [26]. Die Ursachen hierfür liegen vor allem in dem aktuell noch relativ geringen therapeutischen Nutzen der Biopsie sowie der technischen Schwierigkeit der Probengewinnung und der Angst vor Komplikationen [27].

Verschiedene Langzeitstudien konnten hier jedoch zeigen, dass bei einem erfahrenen Team die Komplikationsrate bei <1% liegt [28, 29]. Eine Empfehlung zur Biopsie laut Leitlinie besteht allerdings erst bei einem hämodynamisch instabilen Patienten mit neu aufgetretener Herzinsuffizienz ohne erklärbare Ursache und erfolgloser Herzinsuffizienztherapie [26].

1.1.3. Die Therapieoptionen der Myokarditis

Die Therapie der Myokarditis sowie der inflammatorischen Kardiomyopathie beinhaltet neben der Empfehlung zur Sportkarenz für 6 Monate überwiegend die medikamentöse Herzinsuffizienztherapie gemäß den Kriterien der New-York-Heart-Association (NYHA) und die Device-Therapie. Zu der aktuell eingesetzten medikamentösen Standardtherapie gehören unter anderem Angiotensinkonversionsenzym(ACE)-Hemmer, Angiotensin-Rezeptor-Blocker, Betarezeptorenblocker und Diuretika [30]. Im Rahmen der Device-Therapie werden Herzschrittmacher, Defibrillatoren und die kardiale Resynchronisierungstherapie zur Herzfunktionsunterstützung verwendet [10]. In fulminanten Fällen kann eine extrakorporale Membranoxygenierung (ECMO) zur Überbrückung genutzt werden [31, 32].

Darüber hinaus konnten zwar in kleinen Studien Erfolge mit kausalen Therapieansätzen gezeigt werden, diese haben allerdings bis jetzt noch keinen Einzug in die klinische Praxis gehalten [30]. Als kausale Therapieansätze wurden vorrangig die Effekte immunsuppressiver und immunmodulierenden Substanzen sowie die Methode der Immunadsorption untersucht.

Der Einsatz des immunmodulatorischen Interferon-Beta, bei Patienten, die an einer chronisch viralen Kardiomyopathie leiden und primär nicht auf supportive Maßnahmen ansprechen, konnte in einer kleinen nicht-kontrollierten Studie eine signifikante klinische und hämodynamische Verbesserung zeigen [12, 33]. In einer letzthin veröffentlichten Studie zeigte sich jedoch in einem größeren Patientenkollektiv kein relevanter hämodynamischer Unterschied zur Placebogruppe [34]. Ob darüber hinaus eine frühzeitige antivirale Therapie die Prognose verbessert und den Krankheitsverlauf gegebenenfalls positiv beeinflusst, ist auf Grund fehlender Daten bis jetzt nicht abschließend geklärt [35].

In zwei kleineren randomisierten placebo-kontrollierten Studien zur inflammatorischen Kardiomyopathie wurde die Wirksamkeit einer immunsuppressiven Therapie mit einer Kombination aus Kortikosteroiden und Azathioprin oder Cyclosporin untersucht [36-38]. Hier zeigte sich, dass bei der richtigen Selektion der Patienten mittels Immunhistochemie

sowie nach Ausschluss von kardiotropen Viren mittels PCR ein positiver Effekt auf die myokardiale Funktion erzielt werden konnte. Escher et al. konnte diesen positiven Effekt auf die Herzfunktion in einer Langzeit-Follow-Up-Studie ebenfalls bestätigen: Bei der iDCM zeigt sich nach immunsuppressiver Therapie sowohl eine anhaltende Verbesserung der linksventrikulären Ejektionsfraktion (LVEF) als auch ein Rückgang der Entzündungsinfiltrate in der Myokardbiopsie [39]. Kontrovers dazu erweisen sich die Daten von Mason et al. im „Myocarditis treatment trial“: Im Vergleich zu der Placebogruppe zeigt sich hier durch eine immunsuppressive Therapie der Myokarditis kein Unterschied der LVEF oder im Überleben. Eine Unterscheidung der Myokarditisätiologie wurde hier jedoch nicht vorgenommen [40].

Auch das Verfahren der Immunadsorption zur Eliminierung kardialer Autoantikörper konnte bei der DCM eine Verbesserung der kardialen Pumpfunktion bewirken [41, 42].

Eine immunsuppressive Therapie mit einer zwei- oder dreifach kombinierten Cyclosporin basierten Therapie zeigte zudem bei Registerstudien zur aggressiven Riesenzellmyokarditis einen positiven Effekt auf das Überleben – hier fehlen jedoch randomisierte Studien [43, 44].

Ebenso konnte in einzelnen Fallberichten sowie kleinen nicht randomisierten Studien zur eosinophilen Myokarditis eine Wirksamkeit einer hochdosierten Kortisontherapie postuliert werden [45, 46].

1.1.4. Prognose der Myokarditis

Der Großteil der an einer akuten viralen Myokarditis erkrankten Patienten mit erhaltener linksventrikulärer Funktion erholt sich spontan, und die Krankheit heilt ohne Residuen aus. Patienten mit einer fulminanten Myokarditis, die die kritische Akutphase überleben, haben ebenfalls eine sehr gute Langzeitprognose [47]. In nur ca. 10% der Fälle entwickelt sich eine chronische Myokarditis [48]. Hier liegt die Vermutung nahe, dass der genetische Hintergrund und die Prädisposition eine entscheidende Rolle spielen. Tierexperimentelle Untersuchungen konnten dies bereits bestätigen [49]. Symptomatische Patienten mit einer eingeschränkten EF von unter 45% haben hingegen eine 4-Jahres-Mortalität von bis zu 56% Patienten, die an einer Riesenzellmyokarditis leiden, haben eine mittlere Überlebensrate von weniger als 6 Monaten [40]. Darüber hinaus lässt sich bei bis zu 40% der Patienten, die an einer DCM erkrankt sind und trotz adäquater Therapie weiterhin Symptome der Herzinsuffizienz zeigen, eine Myokarditis nach immunhistochemischen

Kriterien nachweisen [37]. Die jährliche Sterblichkeitsrate eines an einer DCM erkrankten Patienten liegt wiederum bei ca. 5% [50].

1.2. Die Pathophysiologie der Myokarditis

Vor allem die viralen und experimentell autoimmunen murinen Myokarditismodelle, auf welche im weiteren Verlauf noch detailliert eingegangen werden soll, konnten maßgeblich zum aktuellen Verständnis der Pathophysiologie beitragen. Zusammenfassend entsteht die Herzmuskelentzündung durch die Interaktion eines externen Pathogens mit dem Immunsystem des Patienten [14].

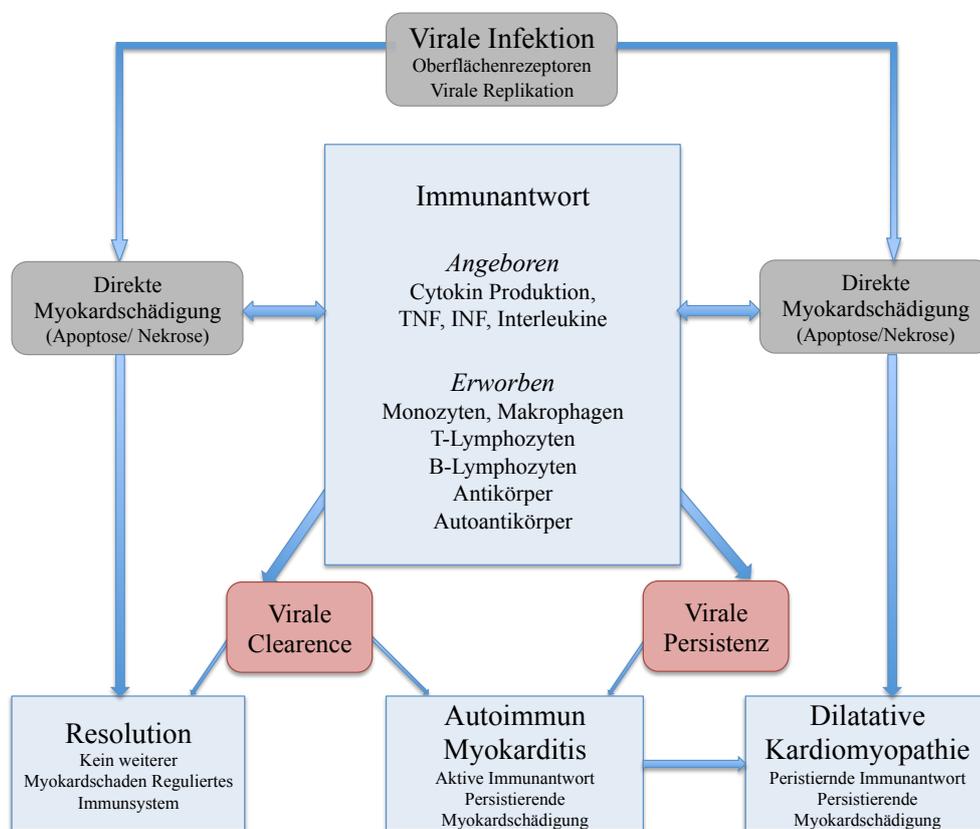


Abb. 1-1: Pathogenese der Myokarditis modifiziert nach [47]

Bei der Myokarditispathogenese können vereinfacht drei große Phasen unterschieden werden. Die erste Phase ist durch Myokardschäden und Aktivierung des angeborenen Immunsystems gekennzeichnet [51]. Bei der viralen Myokarditis wird dies auch als die akute virale Phase bezeichnet, die sich durch die Aufnahme des Virus in das Myokard auszeichnet. Der Zutritt des Pathogens in das Gewebe gelingt mit Hilfe von speziellen Rezeptorzellen [14]. Durch Virusproliferation im Gewebe kann es nun zum direkten

Schaden und Zytolyse der Kardiomyozyten kommen [12]. Diese erste virale Phase ist in der Regel sehr kurz und tritt klinisch selten in Erscheinung.

Die zweite Phase ist durch die akute Entzündung des Myokards und Reaktion des Immunsystems gekennzeichnet. Der erste Kontakt zwischen Patient und Pathogen wird durch das angeborene Immunsystem vermittelt, was zur Zytokin-Produktion und in einem zweiten Schritt zur Aktivierung des erworbenen Immunsystems mit Expansion der B- und T-Zellen führt. Die stimulierten T-Zellen erkennen nun virales Protein, welches ihnen mit Hilfe von MHC-I-Proteinen auf der Kardiomyozyten Oberfläche präsentiert wird [52]. T-Killerzellen können Viruszellen oder infizierte Zellen direkt angreifen und aktivieren gleichzeitig B-Zellen, die spezifische Antikörper produzieren. Dies trägt maßgeblich zur Reduktion der Viruslast, aber auch zur subakuten und chronischen Entzündung mit kardialen Remodeling, bei [14].

In der dritten Phasen kommt es somit in den meisten Fällen durch die adäquate Immunreaktion zur Viruselimination und in Folge dessen zur Ausheilung der Myokarditis [32]. Im Zuge der Immunsystemaktivierung können aber auch Bestandteile des Myokards, wie zum Beispiel kardiales Myosin, von den T-Zellen falsch erkannt werden. Ursache dieses Falscherkennens sind wahrscheinlich Ähnlichkeiten in den DNA-Sequenzen des Virus und verschiedene Strukturen des Myokards. Diese Strukturverwandschaft des viralen Genoms wird auch molekulare Mimikry genannt. Dieses Falscherkennen von körpereigenen Strukturen ist wesentlicher Bestandteil der Entwicklung einer autoimmunen Reaktion mit persistierender Myokardschädigung [14]. Durch diese körpereigenen kardialen Proteine kann das angeborene Immunsystem aber auch direkt aktiviert werden. Dies hat wiederum die Aktivierung von Toll-like-Rezeptoren (TLR) und Inflammosom und somit die Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen, Tumornekrosefaktor α (TNF α) und Interleukin β (IL1 β) zur Folge [51]. Es konnte gezeigt werden, dass vor allem TLR2 und TLR4 durch kardiales Myosin aktiviert wird [51]. Durch diese pathologisch persistierende Immunantwort kommt es zu einer chronischen myokardialen Entzündungsreaktion, dem kardialen Remodeling. Dieser strukturelle Umbau ist durch eine voranschreitende Fibrose mit kardialer Dilatation bis hin zum Funktionsverlust gekennzeichnet und führt letztendlich zur Entwicklung einer chronisch dilatativen Kardiomyopathie. Hier spielen vor allem so genannte Matrixmetalloproteinasen, die durch Zytokine aktiviert werden, welche wiederum durch das angeborene und durch das erworbene Immunsystem freigesetzt werden, eine wichtige Rolle. Diese Proteasen können interstitielles Kollagen und Elastin zersetzen und tragen so zur Entzündung und Fibrosierung bei [14]. Klinisch zeigt sich eine

systolische und diastolische Dysfunktion bis hin zum akuten Pumpversagen mit plötzlichem Herztod.

1.3. Die Bedeutung der Autoimmunität bei der Entwicklung einer Myokarditis

Neben einigen selten rein autoimmunen Formen der Myokarditis, wie zum Beispiel die Myokarditiden im Rahmen einer systemischen Autoimmunerkrankung, der Riesenzell-myokarditis oder auch der toxischen Myokarditis, besteht der Verdacht, dass es auch im Rahmen der viral induzierten Myokarditis zu einer akuten und persistierenden Autoimmunreaktion mit Entwicklung einer iDCM kommen kann [53]. Ursächlich dafür ist das Immunsystem: Bei einer pathologischen Überreaktion entsteht ein dauerhafter Aktivierungsgrad und in Folge dessen eine chronische Entzündung. Eine zu geringe Reaktion ist Ursache für eine unzureichende Viruselimination mit konsekutiver Viruspersistenz [14, 54]. Anzeichen der Autoimmunität sind unter anderem wie bereits oben beschrieben die Präsenz von Autoantikörpern, die bei Patienten mit Myokarditis oder DCM nachgewiesen werden konnten. Die Antikörper richten sich gegen verschiedenste Antigene, darunter sind einige herz-spezifisch wie zum Beispiel Antikörper gegen kardiales Myosin. Andere relevante Antikörper richten sich unter anderem gegen Beta-1-Adrenorezeptoren, Mitochondrien, muscarinerge Rezeptoren, sarkolemnale Na-K-ATPasen und Laminin [55]. Bei 59% der an Myokarditis erkrankten Patienten konnten herz-spezifische Autoantikörper im Serum nachgewiesen werden [56]. Bei Patienten mit DCM sind es 66%-86% [57]. Ebenfalls konnten einige Studien zeigen, dass das Vorhandensein der Antikörper gegen kardiales Myosin mit einer Verschlechterung der Herzfunktion einhergehen kann [58]. Bei der genaueren Klassifizierung der Anti-Myosin-Antikörper konnte dargestellt werden, dass es sich bei der DCM hauptsächlich um Antikörper der IgG3 Unterklasse handelt [59].

1.4. Die Myokarditis im Mausmodell

Um den Pathomechanismus und die pathogenen Faktoren bei Entstehung der Herzmuskelentzündung besser analysieren zu können, wurden mehrere Mausmodelle für die Forschung entwickelt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit werden wir uns jedoch auf die 2 Hauptmodelle beschränken: CVB3 und EAM. Zum einen ist es möglich mit Hilfe einer Cocksackievirus B3(CVB3)-Infektion ein Virus induziertes Modell der Myokarditis zu erhalten und zum anderen lässt sich mittels Immunisierung gegen kardiales Myosin eine experimentelle Autoimmunmyokarditis (EAM) erzeugen. Das CVB3-Modell zeigt nach einer akuten Phase der viralen Myokarditis bei bestimmten Mausstämmen wie A/J auch

den Übergang in eine zweite, chronische Phase mit Fibrose, Zellnekrose und DCM. Ein Virusnachweis gelingt in der zweiten Phase in der Regel nicht mehr [60]. Der Vorteil der virusinduzierten Myokarditis ist, dass der Großteil der humanen Herzmuskelentzündungen ebenfalls viral ausgelöst wird und somit ein realitätsnahes Modell geschaffen wurde. Ein Nachteil ist die erhöhte Komplexität in der Handhabung, was maßgeblich durch die Infektiosität im ersten Stadium bedingt ist. Das Modell der EAM hingegen ermöglicht die isolierte Betrachtung der autoimmunen Komponente ohne die Schwierigkeiten eines infektiösen Modelles. Es kann vor allem die zweite, chronische Phase genauer untersucht werden. Bei beiden Modellen kommt es sowohl zur Herzmuskelentzündung, als auch zur Bildung von herzspezifischen Autoantikörpern [61].

Bei der Induktion der Myokarditis spielt der genetische Hintergrund der Tiere eine entscheidende Rolle. Es konnte gezeigt werden, dass nur bestimmte Mausphänotypen nach Virusexposition oder Immunisierung in der Lage sind eine Myokarditis zu entwickeln. Tiere mit einem genetischen A-Hintergrund wie A/J, A.CA und A.SW zeigen nach CVB3 Infektion und Immunisierung eine ausgeprägte Myokarditis [60], wohingegen Tiere mit einem B10-Hintergrund wie C57BL/10J, B10.A, B10.S und B10.PL sich resistent zeigten [49, 62]. Da die Tiere mit A-Hintergrund sich hauptsächlich in den MHC-II-Genen unterscheiden, wird davon ausgegangen, dass Gene des MHC der Klasse II für die Schwere und Ausprägung der Erkrankung verantwortlich sind [60]. Beim Vergleich von Tieren mit dem gleichen MHC aber A- und B Hintergrund konnte allerdings bestätigt werden, dass hauptsächlich Nicht-MHC-Genloci die entscheidende Rolle spielen [60]. Hier sind vor allem EAM1 auf Chromosom 1 und EAM2 auf Chromosom 6 zu nennen, die unter anderem Einfluss auf die T-Zell Apoptose haben [63]. Genau diese Gene konnten auch bei anderen autoimmuninduzierten Erkrankungen, wie dem Lupus erythematodes, Diabetes mellitus und der autoimmun Thyreoditis im murinen Modell als relevant identifiziert werden [60]. Balb/c Mäuse, die Gene der MHC-Klasse II besitzen, sind ebenfalls in der Lage eine Autoimmunmyokarditis zu entwickeln. Analog zu dem Pathomechanismus der A/J Mäuse benötigen Balb/c Mäuse dazu aktivierte Lymphozyten [64]. Sie werden in dieser Arbeit als zugrundeliegendes Tiermodell genauer betrachtet.

1.4.1. Der zeitliche Verlauf der Experimentellen Autoimmunmyokarditis

Im Folgenden soll nun auf die verschiedenen Phasen der EAM, die als Tiermodell wesentlicher Bestandteil dieser Arbeit ist, genauer eingegangen werden. Nach zweimaliger Immunisierung mit Myosin an Tag 0 und Tag 7 zeigt sich an Tag 21 der Erkrankung das größte Ausmaß der Entzündung. Ebenfalls lassen sich die höchsten Antimyosin-

Antikörperspiegel in murinen Seren am Tag 21 nachweisen. Im weiteren zeitlichen Verlauf kommt es zur Abnahme der akuten Entzündungsinfiltrate und zur Zunahme der Fibrose. Ab Tag 35 können vermehrt Zeichen der DCM und des Herzversagens mittels Echokardiographie nachgewiesen werden [65].

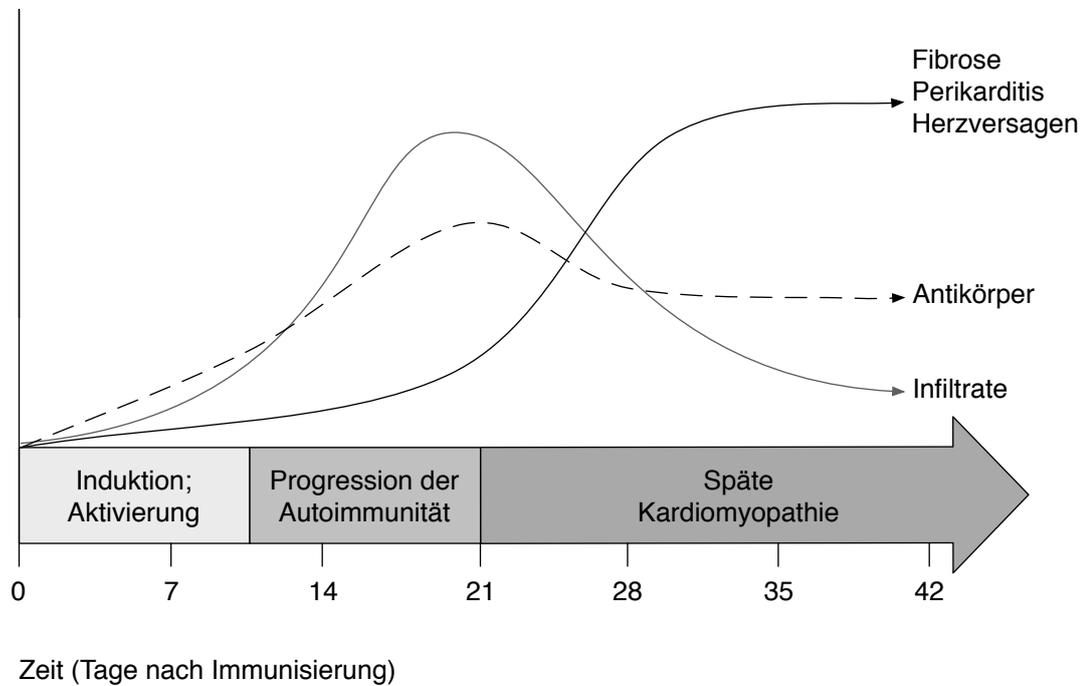


Abb. 1-2: Die Phasen der Experimentellen Autoimmunmyokarditis (EAM) im Mausmodell modifiziert nach [65].

1.4.2. Zelluläre Komponenten der kardialen Entzündung

Analog zu den bereits oben beschriebenen Phasen der Myokarditis zeigt sich bei immunisierten Mäusen um den Entzündungspeak an Tag 21 ein prozentual größerer Anteil an Leukozyten als bei gesunden Tieren. Die genaue Differenzierung der Leukozytensubpopulationen macht deutlich, dass der Schweregrad der akuten Myokarditis mit dem prozentualen Anteil an Makrophagen ($CD11b^+/Gr1^-$) korreliert [66]. In der chronischen Phase der Myokarditis zeigt sich ebenfalls eine Korrelation zwischen dem Anteil der T-Helfer-Zellen ($CD4^+$) und kardialen Funktionsparametern wie ein erhöhtes enddiastolisches Volumen und eine erniedrigte Pumpfunktion [66]. Grundsätzlich zeigt sich bei der Differenzierung der T-Helferzellen bei der EAM eine Dominanz des Th-2 Subtyps sowie Th17 positiver Zellen [67, 68]. T-regulatorische Zellen hingegen haben bei der Entstehung einer Autoimmunreaktion als antiinflammatorischer Gegenspieler der Th-17 Zellen *in vitro* eher einen protektiven Einfluss und tragen zur Unterdrückung einer Autoimmunreaktion bei. *In vivo* allerdings ist dies von verschiedenen Umgebungsfaktoren, wie z.B. den beteiligten Pathogen stark abhängig [69, 70].

Zytokine spielen bei der Pathogenese der Myokarditis ebenfalls eine wichtige Rolle. Eine intensive Antwort des angeborenen Immunsystems auf eine virale Infektion mit Bildung von Interleukin-1 β (IL-1 β) und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) ist pathognomonisch für die Entwicklung einer herzspezifischen Autoimmunerkrankung [71]. Im Mausmodell konnte auch gezeigt werden, dass IL1 β und Interleukin-17A (IL17a) das kardiale Remodeling induzieren und essenziell für die Entwicklung einer DCM sind [51, 72, 73]. Ebenso konnte gezeigt werden, dass die Einwanderung Prominin-1 positiver Stammzellen in der akuten kardialen Entzündungsphase die entscheidende zelluläre Grundlage für die Entwicklung einer späteren kardialen Fibrose durch Induktion von Fibroblasten und Makrophagen darstellt [74].

1.5. Die VCAM-1/VLA-4-Achse und ihre Bedeutung bei der Entzündungsentstehung

Zelladhäsionsmoleküle (CAMs) und ihre verschiedenen Interaktionen spielen eine entscheidende Rolle bei der Entzündungsreaktion und Immunantwort des Körpers. Es handelt sich dabei um integrale Membranproteine, die an der Zelloberfläche exprimiert werden und mit anderen Proteinen in Wechselwirkung treten können. Im Blut zirkulierende Leukozyten sind durch eine Interaktion mit CAMs in der Lage sich an das Gefäßendothel anzuheften und können so in das entzündete Gewebe migrieren [75].

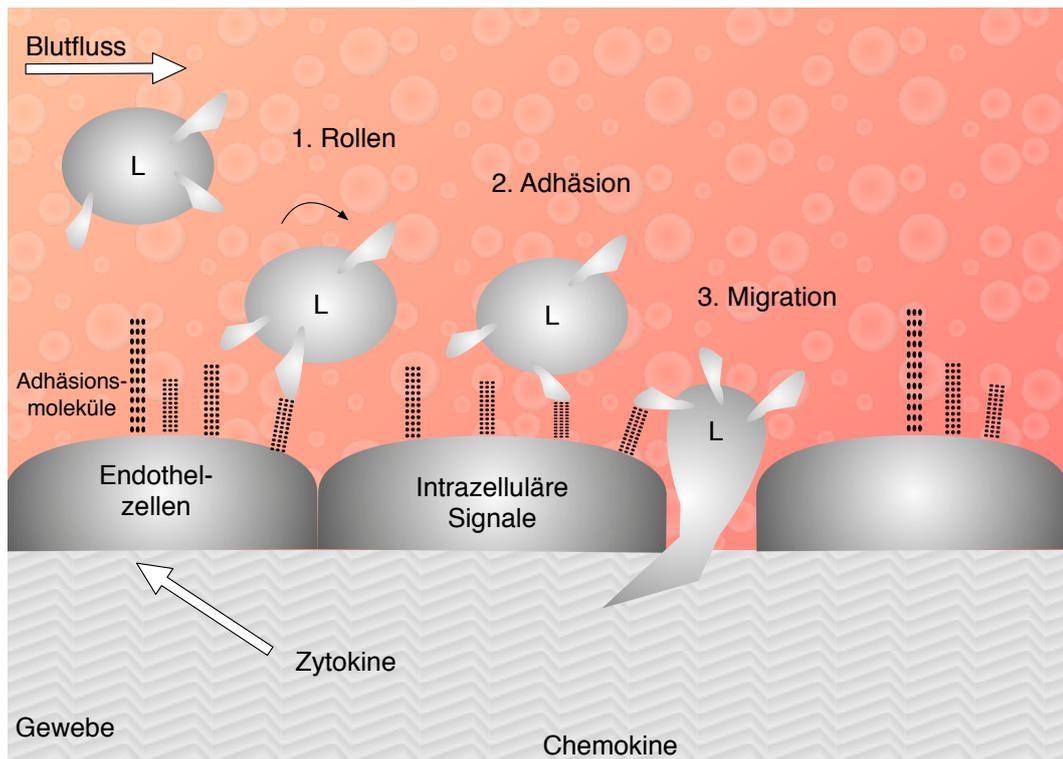


Abb. 1-3: *Transendotheliale Leukozyten Migration [75]*

Während eines Entzündungsprozesses entstehen Zytokine, die im Gewebe gebildet werden und die Expression von Zelladhäsionsmolekülen, wie VCAM-1, induzieren. Zusätzlich werden chemotaktische Lockstoffe sowohl vom Gewebe als auch von den Endothelzellen freigesetzt, die die Affinität des Zelloberflächenrezeptors der Leukozyten erhöhen und richtungweisende Eigenschaften besitzen. Bei der Leukozytenmigration werden 3 Schritte durchlaufen: 1. Das sogenannte Rollen der Leukozyten entlang des Endothels, welches mit einer geringen Rezeptoraffinität einhergeht, 2. Das Anheften der Leukozyten am Endothel durch eine hohe Rezeptoraktivität, die eine feste Bindung erst ermöglicht und 3. Die Transmigration des Leukozyten durch das Endothel in das Entzündungsgewebe.

Die Zelladhäsionsmoleküle, die hauptsächlich bei der Leukozytenadhäsion beteiligt sind, lassen sich in vier Hauptgruppen unterteilen: Integrine, Immunglobulin-Superfamilie (IgSF), Selectine und Catherine [76]. VLA-4 (Very-Late-Antigen-4) ist ein Zelloberflächenrezeptor und wird vor allem auf Lymphozyten, Monozyten und Eosinophilen aber nicht auf Neutrophilen exprimiert. Er gehört zu der Gruppe der Integrine und besteht aus einer α - und einer β -Untereinheit. Der Hauptbindungspartner von VLA-4 ist VCAM-1, ein Protein der Immunglobulin-Superfamilie, welches hauptsächlich von Endothelzellen exprimiert wird [76]. Die Expression von VCAM-1 wird dabei von Zytokinen, wie zum Beispiel Tumornekrosefaktor (TNF- α) und Interleukin (IL-1 β), die in den Entzündungsgebieten entstehen, induziert [75]. Die Bindung und letztendlich die Migration der Leukozyten ist abhängig von der Rezeptoraffinität des Integrins (VLA-4) zu VCAM-1. Das menschliche VCAM existiert in 2 Splicevarianten, die entweder sieben oder sechs immunglobulinähnliche Domänen mit Disulfidbrücken enthalten. Der 6-Domänen Form des

VCAM-1 fehlt Domäne vier [77]. Die Domänen eins und vier enthalten die Bindungsstellen für die Integrine. Bei der Maus liegt VCAM-1 zwar auch in der 7-Domänen Form vor, aber die 6-Domänen Form fehlt. Dafür lässt sich eine einzigartige 3-Domänen Form nachweisen [78]. Der intrazelluläre Teil von VCAM-1 interagiert mit Ezrin, auch bekannt als Zytovillin oder Villin-1, und Moesin. Beide Proteine gehören zur ERM-Protein-Familie, die Transmembranproteine mit dem Aktin Zytoskelett verbinden [79]. Zudem aktiviert die Integrinbindung an VCAM-1 Rac1 eine Rho-like-GTPase, welche ebenfalls in der Lage ist auf das Zytoskelett Einfluss zu nehmen und die Tight-Junctions zwischen den Endothelzellen zu modifizieren [80]. Somit ist die Grundlage für eine Zellstrukturänderung geschaffen, die eine transendotheliale Leukozytenmigration möglich macht.

1.5.1. Das lösliche sVCAM-1

VCAM-1 kann durch Spaltung von Disintegrin- und Metalloprotease 17 (ADAM 17), ADAM 8 und ADAM 9 von der Endotheloberfläche abgelöst werden und ist dann als lösliches sVCAM-1 im Plasma zu finden [75]. Die Plasmaspiegel des sVCAM-1 steigen mit verstärkter Aktivierung des Endothels bei verschiedensten Erkrankungen an und werden zum Teil als prädiktive Biomarker genutzt [81, 82]. So konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass Patienten mit Koronarer Herzkrankheit erhöhte sVCAM-1 Spiegel vorweisen oder Dialysepatienten mit hohen sVCAM-1 Spiegeln im Serum häufiger eine PAVK entwickeln [83, 84]. Bei Patienten mit kolorektalem Karzinom konnte nachgewiesen werden, dass die sVCAM-1 Spiegel signifikant erhöht sind und eine Zunahme des Plasmalevels mit dem Tumorwachstum und Metastasierungsgrad korrelieren [85]. Weitere Untersuchungen konnten darstellen, dass Erkrankungen wie Arteriosklerose und Rheumatoide Arthritis ebenfalls mit erhöhten sVCAM-1 Plasmalevel einhergehen [86, 87]. Die Aufgabe des löslichen VCAM-1 ist noch nicht vollständig geklärt. Dennoch gibt es einige Hinweise, dass es als chemotaktischer Agent für Leukozyten agiert und die Migration in das entzündete Gewebe induziert [88, 89]. Zum anderen bindet lösliches sVCAM-1 an freie Leukozyten und limitiert somit ihre Bindung an endothelständiges VCAM-1.

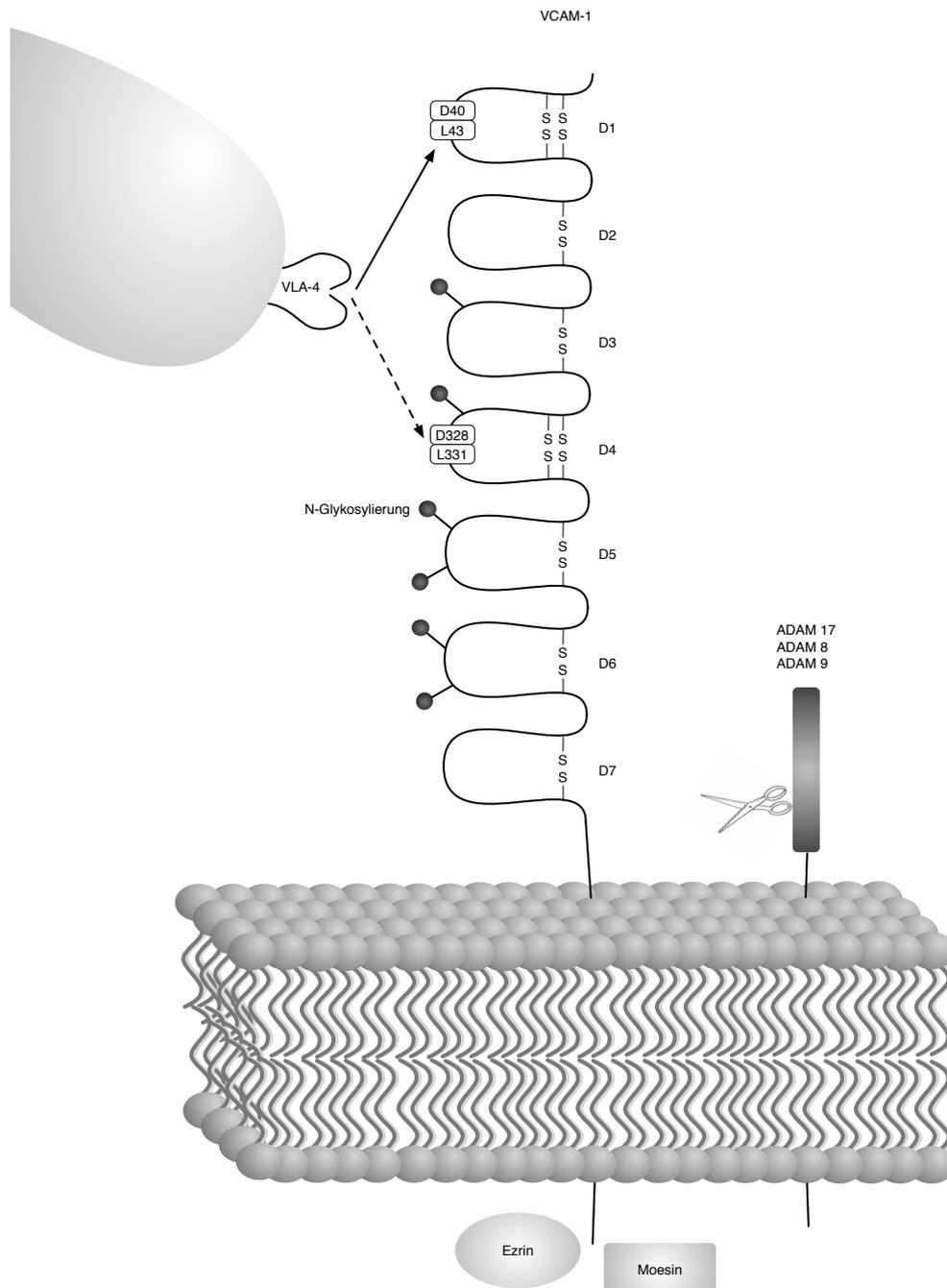


Abb. 1-4: Liganden Bindung zu VCAM-1 modifiziert nach [75]

Die Bindung des Integrins zu VCAM-1 ist abhängig vom Aktivierungsstatus. Das $\alpha\beta 1$ -Integrin bindet an die Domäne 1, aber um die Bindung an Domäne 4 zu ermöglichen, wird eine größere Affinität des Rezeptors zum Liganden benötigt. VCAM-1 interagiert ebenfalls mit Ezrin und Moesin. VCAM-1 kann mit Hilfe von ADAM17, ADAM8 und ADAM9 von der Endothelzelloberfläche abgelöst werden. D=Domäne

2. FRAGESTELLUNG

Wissenschaftliche Vorarbeiten konnten zeigen, dass die VCAM-1/VLA-4-Achse bei entzündlichen Prozessen eine entscheidende Rolle bei der Rekrutierung und Migration von Entzündungszellen spielt [75]. Im Rahmen der Myokarditis kommt es zu einer Inflammation des Myokards, wobei histologisch Entzündungsinfiltrate nachgewiesen werden können [10]. Eine Vielzahl unterschiedlicher Entzündungszellen sind darüber hinaus maßgeblich am kardialen Remodeling beteiligt und beeinflussen hierüber die myokardiale Funktion [73, 74]. Eine Untersuchung der VCAM-1/VLA-4-Achse im Kontext der Myokarditis ist bisher nicht erfolgt.

Ziel dieser Arbeit war es die Inhibition der VCAM-1/VLA-4-Achse mit Hilfe eines VLA-4-Antikörpers im Tiermodell der EAM zu untersuchen.

Folgende Fragen standen dabei insbesondere im Vordergrund:

- Kommt es im Rahmen der EAM zu einer Aktivierung der VCAM-1/VLA-1-Achse im murinen Herzen?
- Ist es möglich sVCAM-1 als Marker für Herzfunktion oder die kardiale Inflammation im Kontext der EAM einzusetzen?
- Kann durch den Einsatz eines VLA-4-Antikörpers die akute Entzündung im Vergleich zu unbehandelten Tieren reduziert werden?
- Wirkt sich die Behandlung mittels VLA-4-Antikörper positiv auf das kardiale Remodeling im Vergleich zu unbehandelten Tieren im chronischen Stadium aus?
- Lässt sich durch die Blockade der VCAM-1/VLA-4-Achse mittels VLA-4-Antikörper eine Verbesserung der kardialen Pumpfunktion im Tier-PET darstellen?

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. Versuchstiere

3.1.1. Gesetzliche Rahmenbedingungen

Für die vorliegende Arbeit wurden Tierversuche gemäß dem deutschen Tierschutzgesetz (TSchG)§7-9 durchgeführt. Die Experimente wurde entsprechend von der Regierung Oberbayerns genehmigt (GZ 55.2-1-54-2532-75-11). Die Organentnahmen wurden in den dafür vorgesehenen Operationsräumen der Medizinischen Klinik und Poliklinik I (Forschungslabor B, Raum U1 312) und der Klinik und Poliklinik der Nuklearmedizin des Klinikums Großhadern durchgeführt.

3.1.2. Eingesetzte Versuchstiere

Alle Versuche wurden an 6-17 Wochen alten männlichen Wildtyp-Mäusen des Inzuchtstammes Balb C mit den entsprechenden Körpergewichten zwischen 19-27g durchgeführt. Alle Versuchstiere wurden über Charles River in Sulzfeld bezogen.

3.1.3. Haltungsbedingungen

Für die Versuche wurden drei bis vier Tiere in den Standardkäfigen Typ II long auf Holzspäne mit ungebleichtem Zellstoff und Papprollen als Nestbaumaterial in einer konventionellen Tierhaltung im Tierstall des Forschungslabor B der Medizinischen Klinik und Poliklinik I der Ludwig-Maximilians-Universität untergebracht. Futter und Wasser stand ad libitum zur Verfügung. Mit Hilfe eines Lichtprogrammes wurde ein 12-stündiger Tag und Nachtrhythmus generiert. Die Raumtemperatur lag zwischen 19 und 21° bei einer Luftfeuchtigkeit von ca. 50%. Eine regelmäßige Kontrolle der Tiere sowie die Reinigung der Käfige waren sichergestellt. Die Hygienebestimmungen wurden nach den Vorgaben der FELASA (Federation of European Laboratory Animal Science Associations) festgelegt, wobei in regelmäßigen Intervallen Sensortiere auf relevante Pathogene untersucht wurden.

Falls die Tiere im Rahmen der Versuche eine Narkose erhielten, wurde darauf geachtet die Tiere bis zum vollständigen Erwachen in Einzelhaltung zu überwachen, bevor sie wieder vergesellschaftet wurden.

Alle Tiere der nuklearmedizinischen Versuche wurden unter vergleichbaren Bedingungen im Tierstall der Nuklearmedizin gehalten.

3.2. Material

3.2.1. Allgemeine Chemikalien und Lösungsmittel

Die aufgeführten Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, in der höchsten Reinheitsstufe (p.A.- Qualität) vom Hersteller bezogen.

BSA (bovines Serumalbumin)	Roth, Karlsruhe
Ethanol 95%, vergällt	Roth, Karlsruhe
Ficoll-Paque PLUS	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
Formalin (Formalaldehyd 4%)	Roth, Karlsruhe
Isotone Natrium-Chlorid Lösung	B Braun, Melsungen
PBS	Invitrogen, Carlsbad, USA
Sheath-Fluid	Beckman-Coulter, Fullerton, USA
Isotone Natriumchloridlösung 0,9%	B Braun, Melsungen

3.2.2. Materialien für Protein-Methoden

Ultraschallhomogenisator	
Kollagenase Typ IV 0,1%	Invitrogen, Carlsbad, USA
Microtitierplatte	
Quantikine (Mouse sVCAM-1)	R&D Systems, Abingdon, UK

3.2.3. Materialien für die Immunisierung

Synthetic Peptide	Caslo Laboratory APs, Dänemark
Complete Freund Adjuvant	Difco Laboratories, Detroit, USA
Drei-Wege-Hahn Discofix	B Braun, Melsungen

3.2.4. Antikörper

FITC (Isotyp Kontrolle)	BD Pharmingen, Heidelberg
PE (Isotyp Kontrolle)	BD Pharmingen, Heidelberg
PerCP (Isotyp Kontrolle)	BD Pharmingen, Heidelberg
CD 45 (PerCP, anti-mouse)	BD Pharmingen, Heidelberg
VLA 4 (PE, anti-mouse)	BD Pharmingen, Heidelberg
CD 4 (FITC, anti-mouse)	BD Pharmingen, Heidelberg
Prominin (FITC, anti-mouse)	BD Pharmingen, Heidelberg
CD 25 (PerCP, anti-mouse)	BD Pharmingen, Heidelberg

Fox P3 (PE, anti-mouse)	BD Pharmingen, Heidelberg
Per-Fix-nc (no centrifuge assay)	Beckmann-Coulter, Marseille

3.2.5. Pharmaka

Heparin-Na 2500IE	B Braun, Melsungen
Natalizumab (Tysabri)	Biogen Idec, Cambridge, USA
Ketaminhydrochlorid (Ketmin-Inresa 0,4mg)	Inresa, Freiburg
Xylazinhydrochlorid (Rompun 2%)	Bayer, Leverkusen

3.2.6. Histologie/Färbungen

Anilinblau	Merck, Darmstadt
Deckgläschen	Menzel, Braunschweig
Einbettkassetten	Engelbrecht, Edermünde
Einbettschälchen	Engelbrecht, Edermünde
Eisenchlorid	Merck, Darmstadt
Eosin	Merck, Darmstadt
Ethanol	CNL, Niederhummel
Essigsäure 0,5%	CNL, Niederhummel
Formaldehyd 4%	CNL, Niederhummel
Hämatoxylin	Merck, Darmstadt
HCl-Alkohol 0,5%	CNL, Niederhummel
Histokitt	Hecht, Sontheim/Röhn
Kernechtrot	Merck, Darmstadt
Mayer's Hämalun	Merck, Darmstadt
Mikrotomklingen	Engelbrecht, Edermünde
Objektträger	Engelbrecht, Edermünde
Paraffin	Engelbrecht, Edermünde
Salzsäure 25%	NeoLab Migge, Heidelberg
Säurefuchsin	Merck, Darmstadt
Wolframatphosphorsäure-Hydrat	Merck, Darmstadt
Xylol	CNL, Niederhummel

3.2.7. Operationszubehör

Baktolin wash	Bode Chemie, Hamburg
---------------	----------------------

Chirurgisches Operationsbesteck	Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten; FMI Föhr Medical Instruments, Seeheim
Feather disposable Scalpel No.11	Feather safety razor, Osaka, Japan
Infrarotlampe	petra electric, Burgau
Kaltlichtlampe/Quelle KL 1500 LCD	Carl Zeiss, Jena
Microlance Einmal-Injektionskanülen	Becton Dickinson, Heidelberg
Spritzen zu 1 und 2 ml (BD plastipark)	Becton Dickinson, Heidelberg
Kinder-EDTA-Rörchen (1,3 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Spritzen BD Micro-Fine – 1 ml	Becton Dickinson, Heidelberg
Sterilium	Bode Chemie, Heidelberg
Untersuchungshandschuhe Peha-soft	Hartmann, Heidenheim

3.2.8. Material für die PET-Untersuchung

Kleintier-PET (Inveon P120)	Siemens, Knoxville, TN, USA
Isofluran	

3.2.9. Geräte und sonstige Materialien

Autoklav Varioklav Dampfsterilisation	H+PLabortechnik, Oberschleißheim
Eppendorf Cups 1,5/ 2 ml	Eppendorf, Hamburg
FACS-Röhrchen 5 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Flasche 500 ml	Schott Duran, Mainz
Filter blau/weiß	
Gefrierschrank Liebherr Premium	Liebherr, Ochsenhausen
Kühlschrank Liebherr Premium	Liebherr, Ochsenhausen
Petrischalen Steriplan	Roth, Karlsruhe
Pipetten 2,5/20/200/1000µl	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
Rotilabo Reaktionsgefäßständer	Roth, Karlsruhe
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, USA
Waage Scout Pro	Ohaus, Giessen
Zentrifuge EBA 12R	Hettich, Bäch, Schweiz
Zentrifuge Multifuge 3L-R	Heraeus Holding, Hanau

Zentrifugenröhrchen 15ml/50 ml Techno Plastic Products, Trasadingen,
Schweiz

3.2.10. Hard-und Software

Photomikroskop M400,	Heer, Wildbrugg, Schweiz
Kamera, Firecam DFC 320	Leica, Solms
FACS (Analysegerät) Coulter Epics XL	Beckman-Coulter, Fullerton, USA
FACS Software Expo 32 ADC	Beckman-Coulter, Fullerton, USA
ELISA-Software XFlour	
BioVet	Spin Systems Pty Ltd., USA

3.3. Methoden

3.3.1. Versuchsdesign

Zum Verständnis der Entstehung und Entwicklung der EAM wurde der übergeordnete Versuchsaufbau in Form einer Zeitreihe ausgewählt. Dazu wurden insgesamt vier Zeitpunkte gewählt, welche in Abhängigkeit von der anschließenden Antikörpertherapie und nach wissenschaftlichen Arbeiten festgelegt wurden [65]. Als Untersuchungszeitpunkte der EAM wurden Tag 14 und Tag 21 nach Immunisierung als repräsentative Zeitpunkte für eine akute myokardiale Entzündung, Tag 49 und 77 als chronische Zeitpunkte festgelegt. Die Immunisierung der Tiere gemäß Kapitel 3.3.4 mit dem myc- α -Myosin erfolgte jeweils an Tag 0 und 7.

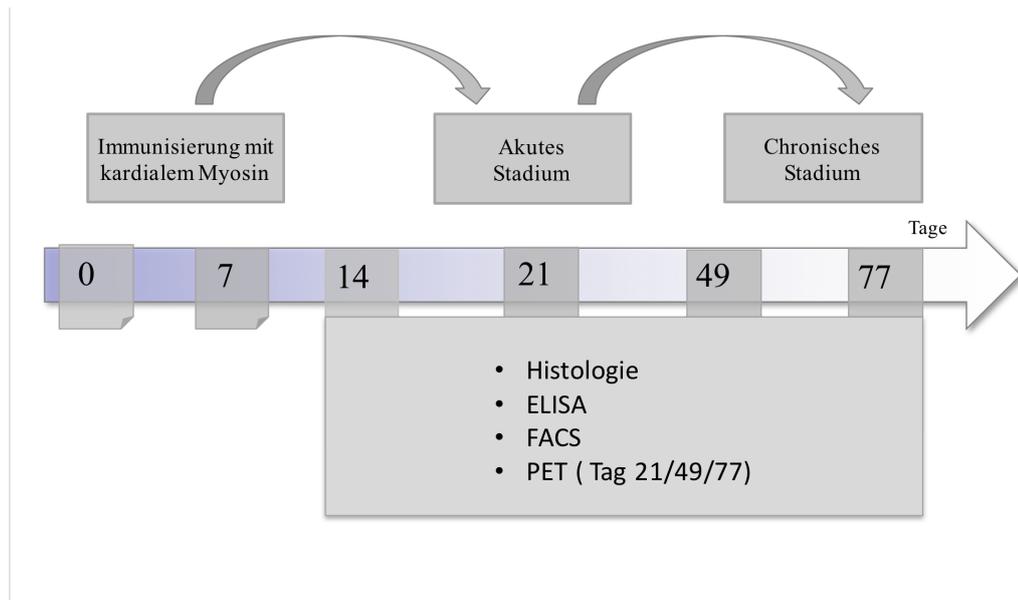


Abb. 3-1: Übersicht des Versuchsaufbaus modifiziert nach Leuschner et al. [90].

Die Immunisierung der Tiere erfolgte an Tag 0 und an Tag 7. Als akute Untersuchungszeitpunkte der EAM wurden Tag 14 und Tag 21 ausgewählt, als chronische Tag 49 und Tag 77.

3.3.2. Der VLA-4-Antikörper Natalizumab

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der VLA-4-Antikörper Natalizumab eingesetzt. Die feste Bindung zwischen VCAM-1 und VLA-4 ermöglicht, wie oben bereits beschrieben, die Migration von Leukozyten in entzündetes Gewebe. VCAM-1 spielt somit bei den unterschiedlichsten Erkrankungen eine wichtige regulatorische Rolle bei der Entstehung von Gewebsentzündungen. Die VCAM-1/VLA-4-Achse stellt somit einen interessanten Ansatzpunkt dar, um auf diese Entzündungsentstehung einzuwirken. Um diese Achse zu modulieren wurde ein VLA-4-Antikörper entwickelt, der 2004 erstmals als Medikament, unter dem Namen Natalizumab, für die schubförmig verlaufende Multiple Sklerose von der U.S. Food and Drug Administration zugelassen wurde [91]. Kurze Zeit später musste der Antikörper aufgrund von Auftreten der progressiven multifokalen Leukenzephalopathie [92] als schwere Nebenwirkungen wieder vom Markt genommen werden. Er wurde erst 2006 nach umfangreichen Studien, die den Nutzen des Medikamentes zeigen konnten, wiedereingeführt [93]. 2006 wurde der Wirkstoff ebenfalls in Europa zugelassen. Die Zulassung wurde einige Zeit später für die Therapie des Morbus Crohn erweitert [94]. Natalizumab ist ein rekombinant hergestellter humanisierter monoklonaler Antikörper, der zur IgG4 Unterklasse gehört und an die $\alpha 4$ -Untereinheit des $\alpha 4\beta 1$ -Integrins (VLA-4) und des $\alpha 4\beta 7$ -Integrins bindet. Der Antikörper wird in murinen Myelomzellen produziert und liegt in der bekannten Struktur der IgG-Antikörper vor. Das Molekül besteht ebenso aus zwei leichten und zwei schweren Ketten, die durch

Disulfidbrücken verbunden sind [95]. Durch die Bindung von Natalizumab an VLA-4, wird eine Interaktion des Integrins mit VCAM-1 verhindert. Natalizumab liegt derzeit als 15 ml Lösung mit einer Konzentration von 20mg /ml vor. Die empfohlene Dosierung sind 300 mg intravenös alle vier Wochen bei einem Körpergewicht zwischen 40-100 kg [95]. Die pharmakologische Halbwertszeit des Medikaments beträgt zwar nur 11 Tage, aber ein länger andauernder Effekt des Antikörpers auf Leukozyten und Chemokine in Blut und Liquor konnte nachgewiesen werden. Natalizumab lässt sich selbst nach Therapieende noch lange im Blut auffinden, wobei die gemessenen Serum Level von Patient zu Patient stark variieren können [96].

3.3.3. Versuchsdesign der Antikörpertherapie

Um einen optimalen Behandlungsansatz für die EAM mit dem VLA-4-Antikörper zu finden, wurden zunächst unterschiedliche Interventionszeitpunkte miteinander verglichen. Zum einen erfolgte die Antikörpergabe gleichzeitig mit der ersten Immunisierung an Tag 0, im Sinne eines frühpräventiven Ansatzes. Die Untersuchung der Tiere wurde an Tag 14 durchgeführt. Für den präventiven Ansatz wurden die Tiere gleichzeitig mit der zweiten Immunisierung mit dem Antikörper an Tag 7 behandelt. Die Untersuchung der Tiere erfolgte an Tag 21. Die Therapie der akuten Myokarditis wurde durch die Antikörpergabe an Tag 21 nachempfunden. Die Tiere wurden hier an Tag 49 untersucht. Die Behandlung der chronisch erkrankten Tiere erfolgte an Tag 49, ihre Untersuchung an Tag 77.

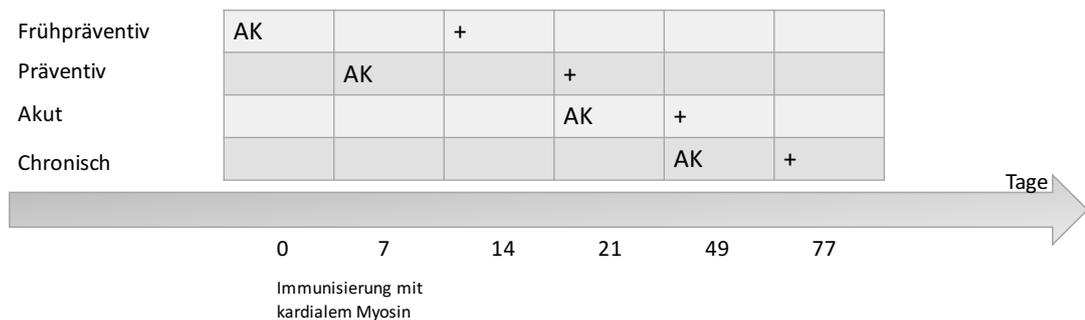


Abb. 3-2: Versuchsdesign der verschiedenen Interventionszeitpunkte

AK= VLA-4-Antikörper Gabe, += histologische Untersuchung der murinen Herzen

Nach Auswertung der histologischen Ergebnisse zu den verschiedenen Interventionszeitpunkten wurde folgender Versuchsaufbau für die Antikörpertherapie festgelegt: Antikörpergabe im akuten Stadium der EAM an Tag 21 und nachfolgende Untersuchungen an

Tag 49, sowie Antikörpergabe im chronischen Stadium an Tag 49 und nachfolgende Untersuchungen an Tag 77.

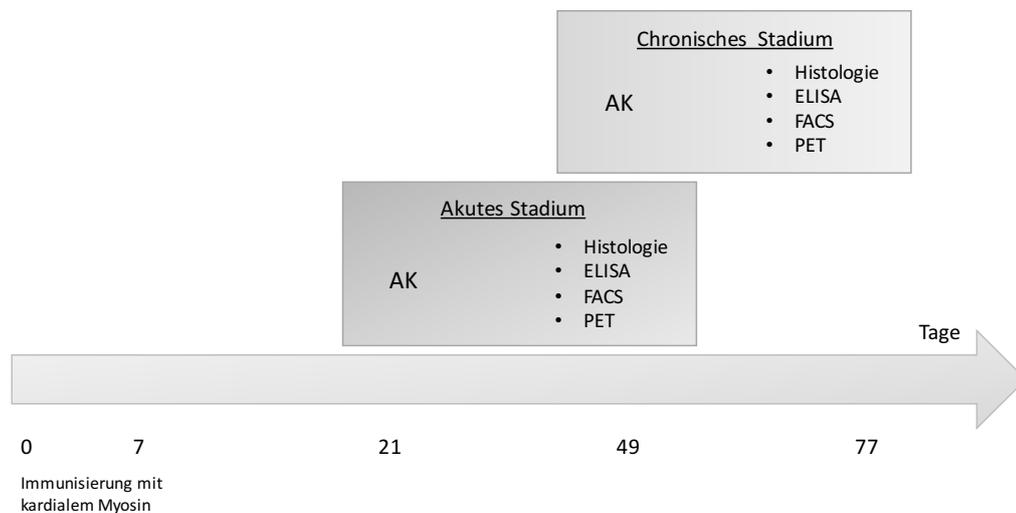


Abb. 3-3: *Versuchsdesign der Antikörperintervention an Tag 21 und 49*

3.3.4. Immunisierung mit dem myc- α Protein

Für das Modell der Experimentellen Autoimmunmyokarditis wird die Herstellung einer autoreaktiven Substanz benötigt, die im Abstand von 7 Tagen zweimal subkutan 5-6 Wochen alten männlichen Balb-C Mäusen appliziert wurde.

3.3.4.1 Herstellung der autoreaktiven Substanz

Hierzu wird ein Muskelprotein, genauer ein Teil der langen Kette des Myosins (Ac-RSLKLMATLFSTYASADR-OH) mit Complete Freund Adjuvant (CFA) in einem Verhältnis von 2:1 gemischt. Complete Freund Adjuvant enthält inaktivierte Tuberculosebakterien und spielt eine wichtige Rolle bei der Aktivierung der Immunreaktion. Das Protein wurde gemäß den Herstellerangaben bei -20° gelagert, der Adjuvant bei Raumtemperatur.

Um das Mischen zu vereinfachen wurde das schlecht lösliche Peptid vom Hersteller in Cups mit je 2 mg vorportioniert. Nach ausführlichem Schütteln, um die abgesetzten Tuberculosepartikel gleichmäßig zu verteilen, wurde das CFA zunächst mit einer Kanüle aus dem vorgefertigten 10 ml-Glasbehälter in eine 10 ml Spritze aufgezogen. Aus der Spritze konnten nun direkt 1 ml CFA zu dem Peptid in das Cup gegeben werden. Um eine Peptidendenaturierung zu verhindern, wurden nun beide Substanzen mit Hilfe einer Pipette durch vorsichtiges Auf- und Absaugen, unter Vermeidung der Entstehung von Luftblasen,

miteinander vermischt. Sobald keine Partikel des Peptids mehr zu erkennen waren, wurde die Mischung mit einer 5ml-Spritze aufgezogen. Die Spritze wurde nun an ein Drei-Wege-System angeschlossen. Auf einer der freien Seite des Systems wurde nun eine weitere 5ml-Spritze mit der exakt gleichen Menge BSA angesetzt. Es erfolgte nun eine langsame Mischung der beiden Substanzen über das System, bis es zu einem deutlichen Widerstandsanstieg kam. Zur Überprüfung des Mischverhältnisses der beiden Stoffe wurde nun ein Tropfen auf eine Wasseroberfläche in einer Petrischale appliziert. Die richtige Mischung war erreicht, sobald der Tropfen seine Form behielt und nicht in das Wasser diffundierte.

3.3.4.2 Immunsierung der Mäuse

Bei jeder Immunisierung sollten 200 μ g der Peptidmischung verabreicht werden. Dazu wurden nun mit einer 1ml-Spritze 200 μ l aus dem Drei-Wege-System abgezogen und mit einer Kanüle in die rechte Seite des Abdomens am Übergang zum Femur subkutan gespritzt. Abdominal zeigte sich nun deutlich sichtbares subkutanes Depot der Substanz. Sieben Tage nach der ersten Immunisierung erfolgte die Wiederholung des Vorgangs. Diesmal wurde das Peptid auf der linken Seite des Abdomens am Übergang zum Femur subkutan appliziert.

3.3.5. Gewebegewinnung

Für die jeweilige Gewebegewinnung wurden die Tiere mit einer Kombination aus 13mg/kg KM Xylaxin und 65mg/kg KM Ketamin in eine tiefe Narkose versetzt, deren Wirksamkeit mittels Reflextestung vor Schnittbeginn überprüft wurde.

3.3.5.1 Herzentnahme

Das Herz wurde an der Einmündung der großen Gefäße angehoben und von diesen getrennt. In einer Petrischale wurden beide Ventrikel mit ca. 10 ml physiologischer Kochsalzlösung durchgespült, um im Lumen verbleibendes Blut und Koagel zu entfernen.

3.3.5.2 Blutentnahme

Das getötete Tier wurde in dorsaler Lage mittels Klebestreifen auf einer Unterlage fixiert. Haut und Abdominalmuskulatur wurden umbilikal bis zum Processus Xiphoideus durchtrennt. Dieser wurde nun mithilfe einer Pinzette angehoben, um mit einer V-förmigen Durchtrennung der Rippen den Thorax zu eröffnen. Das noch schlagende Herz wurde

vorsichtig an seiner Basis mit einer Pinzette fixiert um mit einer 20 G Kanüle den linken Ventrikel apikal zu punktieren und das Blut langsam in eine 2 ml Spritze zu aspirieren.

3.3.6. Histologische Untersuchungen

Die histologischen Schnitte wurden in Kooperation mit der Tierpathologie (Fr. Dr. vet Nadja Herbach) der Ludwig-Maximilians-Universität angefertigt und ausgewertet.

Nach Abschluss der Blutentnahme und Erliegen des Kreislaufes wurde der Thorax eröffnet und das Herz nach Durchtrennen der beiden Venae Cavae und der Aorta, entnommen. Um die Herzkammern von Blutresten und Koageln zu befreien, wurde das Herz retrograd über die Aorta mit NaCl durchgespült und anschließend für 24-48h Stunden in einer 4 %-igen Formalin- Lösung fixiert. Daraufhin wurde die Probe in Ethanol (70%) überführt und entwässert. Abschließend erfolgte die Einbettung des Herzens in Paraffin. Für die histologischen Bestimmungen wurde das Herz mit einem Paraffin-Schneidegerät in 4 µm dicke Scheiben geschnitten und auf Adhäsions-Objektträgern platziert.

3.3.7. Färbungen

3.3.7.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Für die Hämalaun-Eosin(HE)-Färbung wurden die Herzschnitte für 5 min in Mayers Hämalaun getaucht und anschließend für weiteren 5 min mit fließendem Wasser gespült und mit HCl-Alkohol (0,5%) differenziert. Nun erfolgte die Behandlung mit Eosin für 2 min und eine erneute Spülung mit Aqua dest. Im Anschluss durchliefen die Objektträger eine aufsteigende Alkoholreihe mit Ethanol 70%, Ethanol 96%, Ethanol 100% und Xylol. Zum Abschluss wurden die Schnitte mit dem Histokitt und den Deckgläschen eingedeckt.

Hämatoxylin ist ein natürlich vorkommender Farbstoff, welcher aus dem Blauholzbaum gewonnen wird und nach Aufbereitung als basisches Hämalaun intensiv färbende Eigenschaften entwickelt. Dieser Farbstoff färbt alle basophilen Strukturen blau, insbesondere Zellkerne und DNA. Eosin hingegen ist ein synthetischer, saurer Farbstoff und färbt alle eosinophilen Strukturen rot. Dazu gehören vor allem Proteine des Zytoplasmas.

3.3.7.2 Masson-Trichromfärbung

Für die Masson-Trichrom-Färbung wurden die Schnitte 5 min in Weigerts Eisenhämatoxylin getaucht, anschließend für 5 min gespült und in HCl-Alkohol differenziert. Nach einer erneuten Wässerung wurden die Herzschnitte für 15 min mit roter Farbe behandelt und im Anschluss wiederum mit Aqua dest. gespült. Nun wurden sie über Essigsäure

(0,5%) Phosphorwolframsäure G für 3 min überführt. Nach einer erneuten Spülung und Behandlung mit Essigsäure (0,5%) wurden die Schnitte für 30 sek. in Anilinblau getaucht. Im Anschluss erfolgte wieder eine Spülung mit Aqua dest. und Essigsäure, bevor sie einer aufsteigenden Alkoholreihe zugeführt wurden. Abschließend wurden die Objektträger analog zu der Hämatoxylin-Eosin-Färbung eingedeckt.

Im Färbeergebnis stellen sich nun kollagenes Bindegewebe, wie z.B. bei einer Herzfibrosierung, blau dar, Zellkerne braunschwarz und alle übrigen Strukturen in Rottönen.

3.3.8. EAM-Score

Um den Schweregrad der EAM zu ermitteln, wurden die HE-gefärbten Schnitte mit Hilfe eines speziellen Entzündungsscores, der die Leukozyteninfiltration in das kardiale Gewebe beschreibt, verblindet ausgewertet und nach folgenden vier Schweregraden eingeteilt. Grad 0 beschreibt unauffälliges Herzgewebe ohne sichtbare Entzündung. Bei Grad 1 zeigen sich zwischen den Kardiomyozyten kleine Herde von Entzündungszellen, wie z.B. Leukozyten, Lymphozyten, Plasmazellen und Neutrophile. Grad 2 beschreibt eine deutlich stärkere Herzmuskelentzündung mit großen Herden von mindestens 100 Entzündungszellen zwischen den Kardiomyozyten. Grad 3 und Grad 4 stehen für eine ausgeprägte Myokarditis, bei der mindestens 10% bei Grad 3 und mindestens 30% bei Grad 4 des Schnittes mit Entzündungsinfiltraten durchsetzt sind.

Tabelle 3-1: Grading der EAM analog zu [97]

Grad 0	keine Infiltrate
Grad 1	kleine Herde von Entzündungszellen zwischen Kardiomyozyten
Grad 2	größere Herde von mind. 100 Entzündungszellen
Grad 3	Es finden sich Entzündungszellen in mindestens 10% der Fläche des histologischen Querschnitts der murinen Herzen
Grad 4	Es finden sich Entzündungszellen in mindestens 30% der Fläche des histologischen Querschnitts der murinen Herzen

3.3.9. Quantitative Fibroseauswertung

Die quantitative Fibroseauswertung erfolgte morphometrisch. Hierbei wurden über ein Photomikroskop (M400, Heer, Wildbrugg, Schweiz) jeweils alle 5-6 Masson-Trichrom gefärbten Herzschnitte in 16-facher Vergrößerung aufgenommen und mit der

angeschlossenen Kamera (Leica Firecam DFC 320, Solms) fotografiert. Mit Hilfe eines speziellen Computerprogramms wurde nun der Anteil der Fibrose am Herzmuskel errechnet. Hierbei wurden 35% der gesamten Schnitte eines Herzens mittels Punkterasters auf Fibrose untersucht und im Anschluss wird, auf das Herzgewicht der Maus bezogen, der prozentuale Fibroseanteil errechnet.

3.3.10. Durchflusszytometrie (Fluorescence Activated Cell Sorting, FACS)

Die Durchflusszytometrie ermöglicht die Analyse von Zellen, die in hohem Tempo einzeln an einer elektrischen Spannung oder einem Lichtstrahl vorbeifließen. Anhand ihrer Oberflächenproteine lassen sich Zellen durch monoklonale, an einen Fluoreszenzfarbstoff gebundene Antikörper klassifizieren. Dieses Verfahren nennt man auch Immunphänotypisierung.

3.3.10.1 Prinzip der FACS-Analyse

Die Zellen in der Suspension werden aus den Probenröhrchen gesaugt und mit hoher Geschwindigkeit durch eine Stahlkapillare geleitet. Mit Hilfe der Trägerflüssigkeit wird nun ein laminarer Hüllstrom erzeugt. Mit dem Eintreten in die Messkammer werden die Zellen so stark beschleunigt, dass sie vereinzelt werden und hintereinander den Analysepunkt erreichen, was auch als hydrodynamische Fokussierung bezeichnet wird. An diesem Punkt werden die Zellen von einem Argonlaserstrahl der Wellenlänge 488nm getroffen. Durch die so entstandene Lichtstreuung kann nun mit Hilfe von Photodetektoren Größe, Granularität und Fluoreszenz gemessen werden. Das Vorwärtsstreulicht (FSC=Forward Scatter) ist ein Maß für die Beugung des Lichts im flachen Winkel und dient vor allem der Bestimmung der Zellgröße. Das Seitwärtsstreulicht (SSC=Sidewards Scatter) ist ein Maß für die Brechung des Lichts im rechten Winkel. Mit Hilfe dieses Parameters wird hauptsächlich die intrazelluläre Granularität, Größe und Struktur des Zellkerns ermittelt. Anhand dieser beiden Messungen lässt sich eine Zelle identifizieren und einer bestimmten Zellpopulation zuordnen.

Neben der Lichtstreuung können mit dem Durchflusszytomter auch Fluoreszenzen gemessen werden. Hierfür verwendet man bestimmte Farbstoffe, wie FITC (Fluorescein-Isothiocyanat), PE (Phycoerythin), PerCP (Peridinin Chlorophyll-A-Protein), welche an Bestandteile der Zelle binden und durch den Lichtstrahl angeregt werden. Die Farbstoffe emittieren nun kurzwellige Lichtspektren, die von Detektoren gemessen werden.

Weiterhin verwendet man Antikörper, die mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind. Die von uns gewählten Antikörper erkennen unter anderem Proteine der CD- (Cluster of differentiation) Klassifizierung. Die Intensität der Lichtemission der Farbstoffe ist proportional zur Anzahl gebundener Antikörper auf der Zelloberfläche und somit auch zur Zahl der Oberflächenmoleküle. Da sich die Spektren der verwendeten Farbstoffe zum Teil überlappen, wird mit Hilfe von Isotypen die Signalverstärkung adjustiert. Isotypen sind unspezifisch bindende Antikörper der jeweiligen Farben. Mit ihrer Hilfe werden die einzelnen Kanäle so eingestellt, dass sich Zellen qualitativ und quantitativ unterscheiden lassen.

3.3.10.2 Probenvorbereitung und Messung

Jeweils an 14, 21, 49 und 77 Tage nach Immunisierung wurde den Mäusen Blut und Herz für die Analyse entnommen.

Für die Entnahme wurden die Mäuse mit 13mg/kg KM Xylaxin und 65mg/kg KM Ketamin narkotisiert und auf der Wärmeplatte fixiert. Mit Hilfe einer kleinen Schere wird das Fell an Bauch und Brust durchtrennt und anschließend der Thorax mit der Knochenschere eröffnet. Daraufhin wird mit einer mit 50µl Heparin gefüllten 2-ml-Spritze wie oben beschrieben das Blut direkt aus dem linken Ventrikel entnommen. Blut und Heparin wurden gut gemischt und vorsichtig auf 3ml Ficoll-Dichtegradient (1077 g/mol) in einem 15-ml-Zentrifugenröhrchen gegeben, so dass zwei getrennte Schichten entstanden. Das Blut wurde nun 30 min bei 136g, 4° C und Bremse auf 1 zentrifugiert und anschließend die mittlere trübe Phase in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt und mit PBS auf 12ml aufgefüllt. In der mittleren Phase, zwischen dem Überstand, bestehend aus Plasma und Thrombozyten, und Ficoll finden sich auf Grund ihrer spezifischen Dichte die mononukleären Zellen wieder. Die mittlere Phase und das PBS werden gut gemischt und für 10 min bei 72g, 4°C und Bremse auf 3 wiederum zentrifugiert. Dieser Schritt wurde noch zweimal wiederholt, wobei jedes Mal der Überstand abgenommen und das Röhrchen mit PBS auf 12ml, bzw. beim letzten Durchgang mit PBS/BSA 2%, aufgefüllt wurde. Anschließend wurde der Überstand bis auf 1 ml abgenommen, die Probe resuspendiert und jeweils 50µl in ein Eppendorf Cup gegeben. Die weitere Befüllung der Cups erfolgte nach dem Pipettierplan in Tabelle 3-3.

In der Zwischenzeit wurde das Herz wie oben beschrieben entnommen und mehrmals mit NaCl retrograd über die Aorta gespült, um Blutreste und Koagel zu entfernen. Danach wurde es in einer kleinen Zellkulturschale mit einem Skalpell in 1mm große Stücke

zerteilt und mit 6 ml Kollagenase-0,1%-Lösung bedeckt. Anschließend wurde die Schale für 45 Minuten bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Mit Hilfe der Kollagenase kommt es nun zur Denaturierung der Myozyten. Nach der Inkubation wurden die Herzstücke durch mehrmaliges Auf- und Absaugen mit einer Pipette noch weiter zerkleinert und die nun entstandene Suspension durch ein 70µm Zellsieb in ein 50-ml-Röhrchen überführt. Es erfolgte nun das Umfüllen der Lösung in ein 12-ml-Zentrifugenröhrchen und das Auffüllen mit PBS auf 12ml. Wie oben bei der Blutprobe schon beschrieben, folgten nun drei zehnmünütige Zentrifugendurchläufe. Als letzter Schritt wurde der Überstand bis auf 1ml abgenommen und die Probe resuspendiert. Wiederum wurden jeweils 50µl in ein Eppendorf Cup gegeben. Von diesem Zeitpunkt an wurden alle Proben identisch weiterbearbeitet. Die Cups wurden auf Eis, wie in den Tabellen 1 und 2 beschrieben, befüllt.

Tabelle 3-2: Antikörperübersicht

Probe 1	CD-45/CD-4
Probe 2	CD-45/ Prominin
Probe 3	CD-45/ VLA-4
Probe 4	CD-4/ CD-25/ FoxP3

Tabelle 3-3: Antikörper, alle Angaben in μl

	Iso	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4
PBS/BSA 2%	20	30	30	30	30
Iso-PE	10				
Iso-FITC	10				
Iso-PerCP	10				
CD-45		10	10	10	
CD-4		10			10
Prominin			10		
VLA-4				10	
Fox P3					10
CD-25					10

Nach dem Pipettieren folgte das Inkubieren der Proben über 45-60 Minuten im Kühlschrank bei einer Temperatur von 4°C .

Zur Analyse der Zellen wurde eine Drei-Farben-Durchflusszytometrie durchgeführt. Zur Unterscheidung von unspezifischer und spezifischer Bindung wurden Isotypen (PE-, FITC- und PerCP markiert) eingesetzt. Die Analyse der Zellen wurde mit einem Zytometer der Firma Beckman Coulter (Coulter Epics XL) und der dazugehörigen Software, dem Programm „Expo 32 ADC“ durchgeführt.

3.3.11. Prinzip des ELISA

Der ELISA ist ein antikörperbasiertes Nachweisverfahren und gehört somit zur Gruppe der enzymatischen Immunadsorptionsverfahren (EIA). Das Prinzip des Verfahrens beruht auf einer enzymatischen Farbreaktion und dient der Quantifizierung von murinem, löslichem VCAM. Die Durchführung erfolgte mit Hilfe eines Kits (Quantikine, Mouse sVCAM-1, R&D Systems), der alle Reagenzien beinhaltet.

3.3.11.1 Probengewinnung und Messung

Für die Messung werden sowohl Blut als auch Herz entnommen, wie oben beschrieben. Die Blutentnahme erfolgte hier mit einer 1-ml-Spritze, welche unmittelbar nach der Entnahme in ein 1,5-ml-EDTA-Röhrchen entleert wurde. Anschließend wurde das Blut 5 Minuten zentrifugiert und das Plasma in ein Eppendorf-Cup pipettiert.

Die entnommenen Herzen wurden wie oben beschrieben in einer kleinen Zellkulturschale mit einem Skalpell zerkleinert und mit 0,1%-Kollagenase 45 Minuten bei 38°C verdaut. Im Anschluss erfolgte das Überführen der Probe durch ein 70µm-Zellsieb in ein 15-ml-Zentrifugenröhrchen. Das Röhrchen wurde mit PBS auf 12ml aufgefüllt und zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgenommen und die Probe in 12ml PBS resuspendiert. Dieser Vorgang wurde noch einmal wiederholt und die Probe in 500ml PBS gelöst, bevor sie mit Hilfe eines Ultraschallhomogenisators lysiert wurde. Sowohl Herz-, als auch Blutproben wurden bei -20°C gelagert.

Für die Durchführung des ELISA wurden nun zunächst die Proben aufgetaut, bis sie Zimmertemperatur erreicht hatten. Anschließend wurde je 50µl Assay Diluent RD1-47 für Serum/Plasma-Proben in die Vertiefungen der 96-well Platte aufgebracht. Danach folgten je 50µl Standard, Kontrolle und Proben. Innerhalb von drei Stunden Inkubationszeit auf dem Schüttler bei Raumtemperatur konnte sich sVCAM-1 so an den immobilisierten Antikörper binden. Es folgte ein vierfacher Waschschrift, bei dem alle ungebundenen Substanzen entfernt wurden. Nun wurden 100µl eines polyklonalen, sVCAM-1 spezifischen, enzymgekoppelten Antikörpers (gebunden an Meerrettichperoxidase) zugegeben, worauf eine weitere Inkubationszeit von einer Stunde auf dem Schüttler bei Raumtemperatur folgte. Nachdem alle Substanzen durch vierfache Aspiration abgewaschen wurden, erfolgte die Zugabe von 100µl Substratlösung, die man für 30 Minuten lichtgeschützt inkubieren ließ. Im Anschluss entstand so eine zu der sVCAM-Menge proportionale grünblaue Farbentwicklung. Die Farbentwicklung wurde nach komplettem Substratumsatz mit je 50µl Stop-Lösung je Vertiefung angehalten, wodurch es zu einem Farbumschlag auf gelb kam. Im Anschluss folgte die Messung der optischen Dichte mit Hilfe eines Densometrie-Gerätes (Absorption bei 450nm, Referenzwert bei 560nm). Mittels der Software XFlour konnten die Extinktionswerte bestimmt werden und aus ihrer kinetischen Kurve mit Hilfe einer Geradengleichung die sVCAM-1-Menge errechnet werden.

3.3.12. PET (Positronen-Emissions-Tomographie)

Die Durchführung der PET-Messungen konnte in Zusammenarbeit mit der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin der Ludwigs-Maximilians-Universität verwirklicht werden. Die Messungen erfolgten jeweils 21, 49 und 77 Tage nach Immunisierung der Tiere.

3.3.12.1 Prinzip der PET Messung

Die Positronen-Emissions-Tomographie nutzt den Zerfall von Radionukliden und die dadurch entstehende Emission von Positronen (Beta-Strahlung). Meist werden diese

Radionuklide in Form eines Radiopharmakons intravenös appliziert. Es kommt zur Wechselwirkung zwischen einem Positron und einem Elektron im Körper. Bei dieser sogenannten Annihilation entstehen zwei hochenergetische Photonen (Energie 511eV, entsprechend 120 EHZ, langwelliger Gammastrahlung), die genau in entgegengesetzte Richtung ausgesandt werden. Ringförmig angeordnete Detektoren messen anschließend die Koinzidenz des Photonenpaares. Von diesen räumlichen und zeitlichen Zerfallsereignissen kann auf die räumliche Verteilung des Radiopharmakons im Körperinneren rückgeschlossen werden.

Als Radiopharmakon werden radioaktiv markierte Substanzen verwendet, die aus zwei Komponenten bestehen: Erstens aus einem Molekül, welches an ein spezifisches Ziel bindet und die Verteilung im Körper bestimmt, und zweitens aus einem radioaktiven Isotop, welches sich durch den PET-Scanner nachweisen lässt.

In der vorliegenden Arbeit wird FDG (F-18-fluor-desoxyglucose) als Radiopharmakon verwendet. FDG wird wie Glucose in den Zellen aufgenommen und phosphoryliert, bietet aber keine Angriffsstelle für die Phosphoglucoisomerase und hat deshalb eine längere intrazelluläre Verweildauer. FDG findet seine Verwendung bei der Darstellung von Entzündungen, kardiovaskulären Erkrankungen, Tumordarstellungen und Neuropathologien.

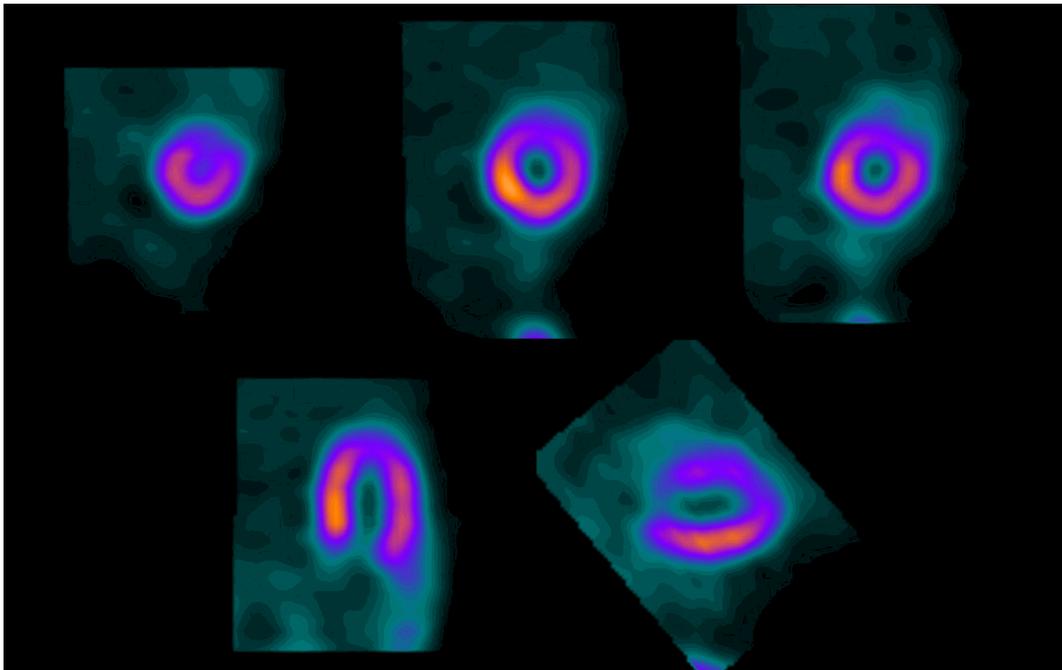


Abb. 3-4: Darstellung eines unbehandelten murinen Herz im Kleintierpet am Tag 21.

25MBq, FDG, Messung mit dem Siemens Inveon P120 PET-Scanner, Darstellung und Auswertung mit Hilfe der Auswertungssoftware QGS 2008.

3.3.12.2 Vorbereitung und Durchführung der Messung

Alle Messungen wurden mit Hilfe des Kleintier-PETs (Inveon P120, Siemens) durchgeführt. Zur Vorbereitung der Messung wurde die zu untersuchende Maus mit Isofluran in Narkose gelegt und ihr ein 4cm langer Katheter in die seitliche Schwanzvene gelegt. Über diesen wurde nun langsam der Tracer (25MBq FDG) injiziert. 20 Minuten nach der Injektion wurde die Maus erneut in Narkose gelegt, um die PET-Messung zu beginnen. Die Isofloranzufuhr wurde nun über die gesamte Dauer der Messung konstant gehalten. Die Maus wurde im Scanner mit Klebestreifen fixiert und die Augen mit Augensalbe geschützt. Daraufhin folgte die Anlage des EKGs an den beiden Vorderpfoten und der linken Hinterpfote. Ebenfalls wurde das Atemkissens angeschlossen. 30 min nach Tracer Injektion wurde nun der Scan gestartet und mit dem Programm BioVet (Spin Systems Pty Ltd., USA) gemessen. Im Anschluss an die Messung folgte entweder die Gabe von 100µl Antikörper oder bei der Kontrollgruppe von 100µl NaCl. Handelte es sich um die zweite Messung, wurden Herz und Blut, wie oben beschrieben, entnommen und für die Untersuchung mittels ELISA vorbereitet.

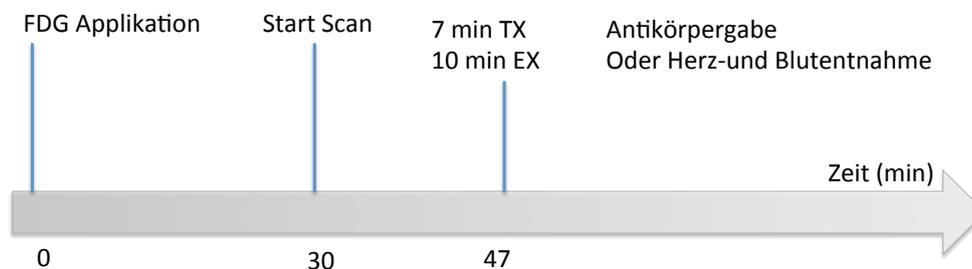


Abb. 3-5: Zeitlicher Ablauf der Micro-PET-Messung

3.3.13. Murine Normwerte der Herzfunktionsparameter

Von Stegger et al. erhoben murine Normwerte der Herzfunktionsparameter mit Hilfe eines Kleintier-PETs zum näherungshaften Vergleich der nachfolgenden Ergebnisse.

Tabelle 3-4: Murine Normwerte der Herzfunktionsparameter modifiziert nach Stegger et al. [98].

	EF (%)	EDV (μ l)	ESV (μ l)
Normwerte	68 \pm 6	72 \pm 12	23 \pm 8

3.3.14. Bestimmung der murinen Körper- und Herzgewichte im zeitlichen Verlauf

Um den Einfluss der EAM oder der Antikörperbehandlung auf die körperliche Entwicklung und damit gegebenenfalls auf die Herzfunktion auszuschließen, wurden Herz- und Körpergewicht gemessen. Die erste Immunisierung der Tiere fand jeweils in einem Alter von 5-6 Wochen statt, so dass im Verlauf der Messungen mit einer Gewichtszunahme zu rechnen war. Alle gemessenen Körpergewichte entsprachen dem Normalgewicht der Balb C Tiere bei altersentsprechendem Wachstum (vgl. Charles River). Zwischen behandelten und unbehandelten Tieren lässt sich außer an Tag 21 ($p=0,01$) kein signifikanter Körpergewichtsunterschied feststellen. Analog zu der Zunahme des Körpergewichts kommt es mit dem Wachstum der Mäuse auch zu einer Zunahme des Herzgewichtes. Behandelte Tiere zeigen an Tag 77 ein signifikant erhöhtes Herzgewicht von 131,6 mg zu durchschnittlich 127 mg bei den unbehandelten Tieren ($p=0,01$). An Tag 14, 21 und 49 zeigt sich kein signifikanter Unterschied durch die Antikörpertherapie.

3.3.15. Statistische Analyse

Die Auswertung aller Daten erfolgte mittels Mann-Whitney-U-Test. Der p-Wert wurde aus dem Mittelwert der Einzelergebnisse mit Hilfe des Tests ermittelt. Als signifikant wurde ein p-Wert $<0,05$, als hochsignifikant ein p-Wert $<0,01$ angenommen und in den Abbildungen entsprechend gekennzeichnet. Die statistische Analyse der Korrelation erfolgte mit Hilfe des Spearman-Korrelation-Test.

4. ERGEBNISSE

4.1. Evaluation der kardialen Infiltration mittels Histologie

Afanasyeva et al. sowie andere Kollegen konnten zeigen, dass im Rahmen der EAM die Infiltration von Entzündungszellen in das Myokard zwischen Tag 15 und Tag 23 stattfindet, wobei Tag 21 den Höhepunkt der kardialen Infiltration darstellt [66] [99]. Zur Etablierung des Modells sowie zur Evaluation der Entzündung an den von uns gewählten Zeitpunkten für die akute und chronische Erkrankung erfolgte zuerst die histologische Evaluation. Die akute myokardiale Inflammation wurde mit Hilfe des in Kapitel 3.3.8 beschriebenen EAM-Score bewertet. Die Auswertung erfolgte verblindet in Zusammenarbeit mit der Tierpathologie der Ludwigs-Maximilians-Universität.

Bei Beurteilung der Herzschnitte zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der Entzündungsausprägung zwischen den Tieren an Tag 21 und den Tieren an Tag 14 und an Tag 77 ($p < 0,05$). An Tag 21 zeigen sich ausgedehnte Entzündungsinfiltrate mit einem durchschnittlichen Score von 2. Analog zu den Beobachtungen von Afanasyeva et al. konnten wir zeigen, dass im chronischen Stadium die myokardiale Infiltration deutlich abnimmt, während das myokardiale Remodeling im Verlauf der Erkrankung zunimmt. Zusammenfassend stellt sich der Höhepunkt der myokardialen Infiltration analog zu den Angaben in der Literatur an Tag 21 des Modells dar (Abb. 4-2).

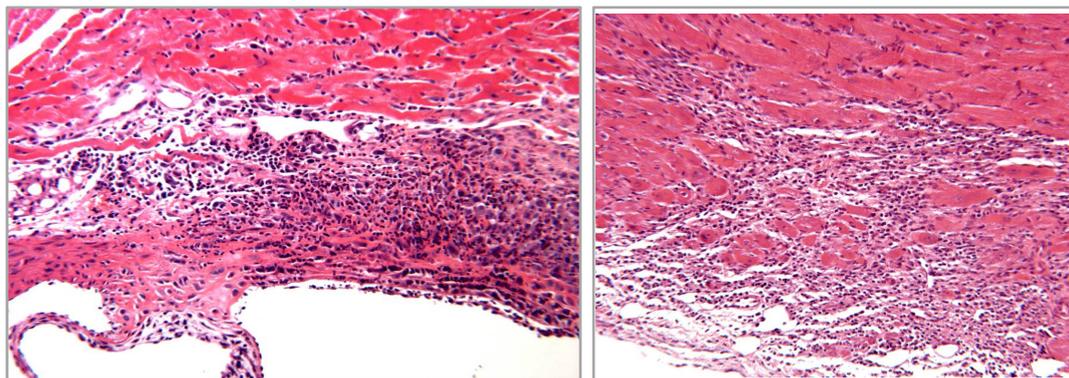


Abb. 4-1: *Histologischer Schnitt des linken Ventrikels eines murinen Herzens 21 Tage nach Immunisierung*

Sichtbar sind eine hochgradige Epi- und Myokarditis, eine hochgradige Vaskulitis am Aortenursprung, und eine fokal ausgedehnte Endokarditis, unter Beteiligung von Lymphozyten, Plasmazellen, Neutrophilen und einzelnen Mastzellen. Linke Abb.: Vergrößerung 10x, rechte Abb.: Vergrößerung 2,5x, HE-Färbung

Abbildung 4-1 zeigt beispielhaft eine ausgeprägte subendokardiale, epikardiale und myokardiale Infiltration an Tag 21.

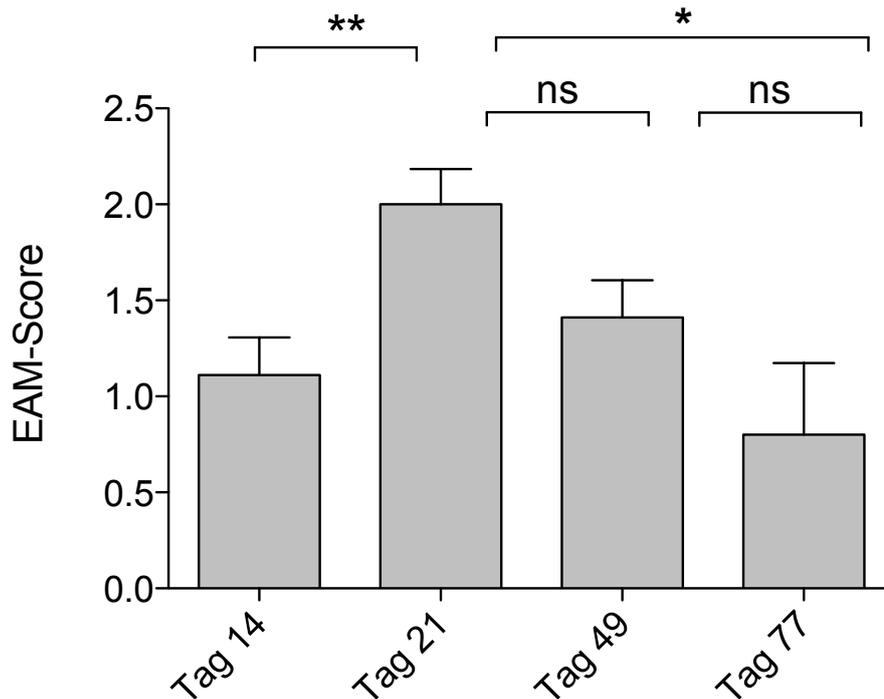


Abb. 4-2: Zeitreihe der akuten Entzündung in der HE-Färbung.

Die akute Entzündung wurde mit Hilfe des EAM-Scores verblindet quantifiziert. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. Sterne zeigen die signifikanten Unterschiede. **: $p < 0,01$, *: $p < 0,05$, ns: nicht signifikant, Tag 14: $n=18$, Tag 21: $n=26$, Tag 49: $n=18$, Tag 77: $n=6$

4.2. Quantifizierung der kardialen Infiltration spezifischer Subpopulationen mittels FACS

Um eine quantitative Aussage über die Einwanderung von ausgewählten an der Myokarditis beteiligten Leukozytensubpopulationen zu treffen, wurden durchflusszytometrische Untersuchungen an Herzgewebe an den vier genannten Zeitpunkten durchgeführt.

4.2.1. Migration von VLA-4+ Zellen im zeitlichen Verlauf

Da im weiteren Verlauf der Arbeit ebenfalls der Einsatz eines monoklonalen VLA-4-Antikörpers bei der EAM untersucht worden ist, war es von besonderem Interesse mehr über das Verhalten des Antigens herauszufinden. Hierzu wurden VLA positive Leukozyten mittels Durchflusszytometrie im murinen Herzen zu den bekannten vier Zeitpunkten bestimmt. Es zeigt sich hier eine signifikante intrakardiale Zunahme der CD45⁺/VLA-4⁺ Zellen an Tag 21 und an Tag 49 im Vergleich zu den gesunden Tieren an Tag 0 ($p < 0,05$). Die Zellzahl an Tag 77 nimmt im Vergleich zu Tag 21 und Tag 49 signifikant ab ($p < 0,05$) (Abb. 4-3a).

4.2.2. Migration von CD45⁺/CD4⁺ T-Helferzellen im zeitlichen Verlauf der EAM

Der Oberflächenmarker CD45 wurde als Panleukozytenmarker eingesetzt. CD4 findet sich als Oberflächenmolekül hauptsächlich auf CD4⁺ T-Helferzellen. Während die Infiltration von T-Helferzellen an Tag 14 noch nicht ausgeprägt erscheint, kommt es im weiteren Verlauf der EAM zu einer signifikanten Infiltration von CD45⁺/CD4⁺ T-Helferzellen in das Myokard ($p < 0,05$) (Abb. 4-3b).

4.2.3. Migration von T-regulatorischen Zellen im zeitlichen Verlauf der EAM

T-regulatorische Zellen spielen im Rahmen von autoimmunen Prozessen eine wichtige Rolle bei der Limitierung der Immunreaktion [70] [9]. Neben den Oberflächenmarkern CD25 (Interleukin-2 Rezeptor) sowie CD4, exprimieren aktivierte T-regulatorische Zellen den Transkriptionsmarker FOXP3 [100]. Im Vergleich zu den gesunden Kontrolltieren an Tag 0 kommt es über den gesamten zeitlichen Verlauf der EAM zu einem signifikanten Anstieg der T-regulatorischen Zellen ($p < 0,05$) (Abb. 4-3c).

4.2.4. Migration von CD45⁺/Prominin-1⁺ Progenitorzellen

Kania et al. konnten zeigen, dass unter anderem aus dem Knochenmark einwandernde Progenitorzellen bei dem Prozess des kardialen Remodeling im Rahmen der Myokarditis maßgeblich mitwirken [101]. Prominin-1 stellt dabei einen Marker dar, der von den Progenitorzellen exprimiert wird, die in das Myokard einwandern, unter Einfluss von TGF- β zu Fibroblasten ausdifferenzieren und so am kardialen Remodeling beteiligt sind [102]. Mit Hilfe der FACS-Analyse konnte gezeigt werden, dass der prozentuale Anteil von CD45⁺/Prom-1⁺ Zellen im akuten Entzündungsstadium an Tag 21 signifikant höher ist als an den anderen Tagen ($p < 0,01$) (Abb. 4-3d).

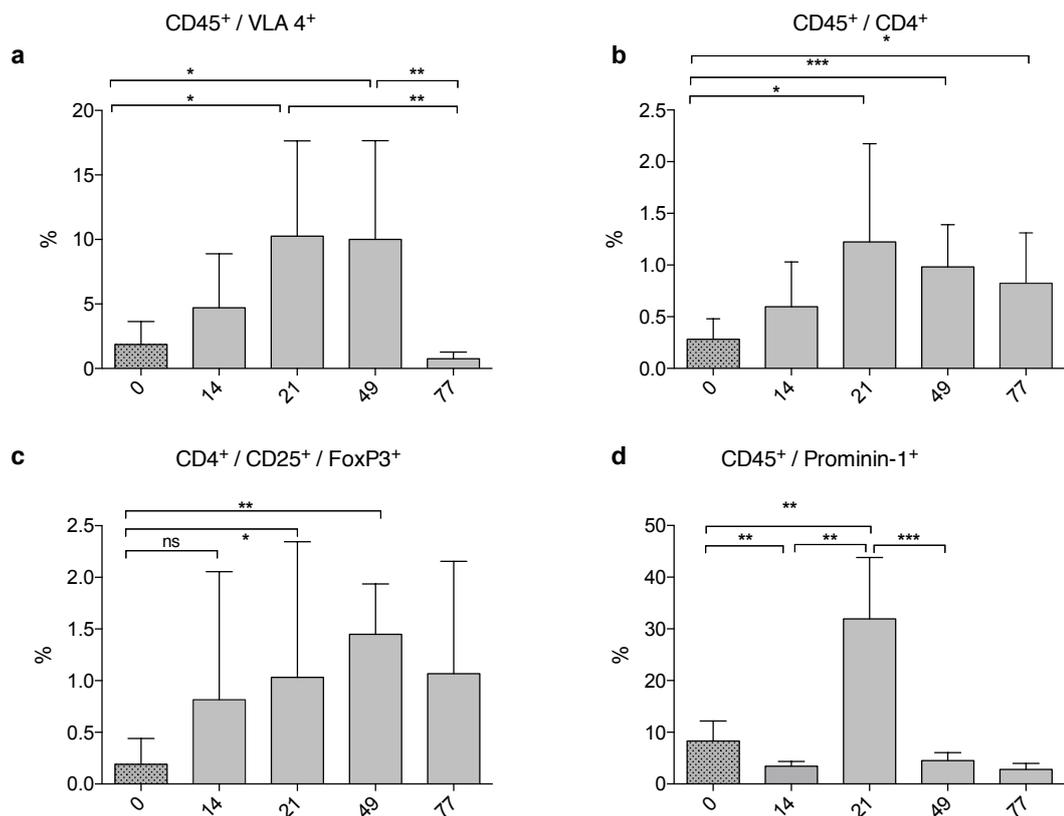


Abb. 4-3: Zeitreihe der prozentualen Verteilung intrakardialer Entzündungszellen. Bestimmung mittels Durchflusszytometrie.

Die Abszisse stellt den zeitlichen Verlauf in Tagen da. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. Sterne zeigen signifikante Unterschiede, *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$, $n=6-12$

4.3. Aktivierung der VCAM-1/VLA-4-Achse

Das Zelladhäsionsmolekül VCAM-1 wird im Rahmen von Entzündungsprozessen auf dem aktivierten Endothel hochreguliert. Durch die Bindung von Leukozyten mittels dem Integrin VLA-4 werden unterschiedliche Schritte der Zelladhäsion- und Migration vermittelt [76]. Eine myokardiale Überexpression von VCAM-1 im Rahmen der akuten Infiltration ist beschrieben, jedoch liegen keine Daten zur Expression im Verlauf der Chronifizierung oder aber über lösliche VCAM-1 Level im Verlauf der Erkrankung vor [103]. Darüber hinaus soll durch die Blockade der VCAM-1/VLA-4-Achse mittels VLA-4-Antikörper eine mögliche Therapieoption abgeleitet werden.

4.3.1. Quantifizierung des kardialen VCAM-1

Zur Evaluation der myokardialen VCAM-1-Expression wurde Herzgewebe mittels ELISA an Tag 14, 21, 49 und an Tag 77 untersucht. Im Vergleich zu gesunden Tieren an Tag 0, bei denen VCAM-1 nicht nachgewiesen werden konnte, zeigte sich an allen

anderen Tagen eine deutliche Zunahme von VCAM-1. Kardiales VCAM-1 wird somit in allen Stadien der EAM hochreguliert (Abb. 4-4).

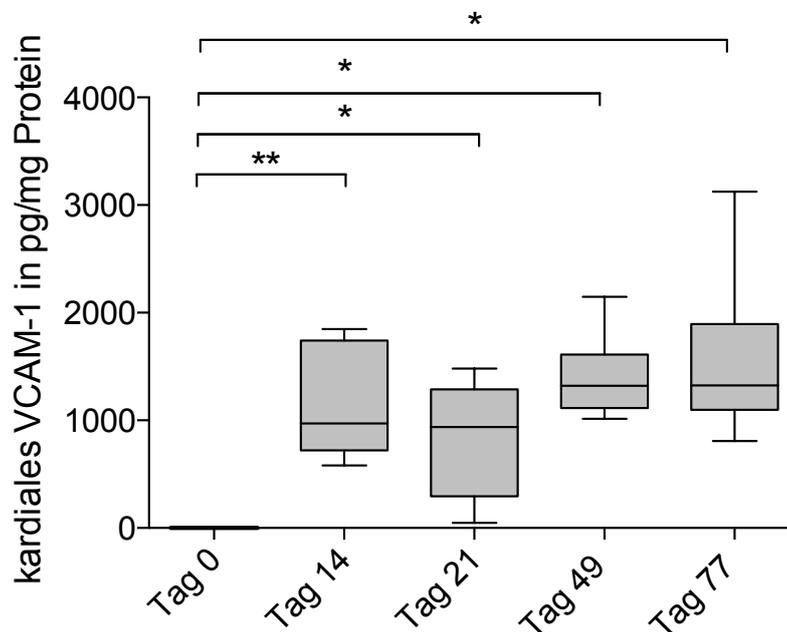


Abb. 4-4: Zeitreihe der kardialen VCAM-1 Spiegel im murinen Herzen

Die Messung erfolgte mittels ELISA. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. Sterne zeigen die signifikanten Unterschiede. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, Tag 0: $n=6$, Tag 14, 21, 49: $n=12$

4.3.2. Quantifizierung der murinen sVCAM-1-Plasmalevel

Das lösliche sVCAM-1 stellt einen Surrogatmarker für die Endothelaktivität und die Aktivierung der VCAM-1/VLA-4-Achse dar. Bei unterschiedlichen autoimmunen Erkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis oder dem SLE konnte nachgewiesen werden, dass sVCAM-1 mit der Krankheitsaktivität korreliert und zum Teil als Biomarker fungiert [81, 104]. Im Folgenden wurden die murinen Plasmaspiegel im zeitlichen Verlauf der EAM quantifiziert. Die Messung der Proteinmenge erfolgte mit Hilfe eines s-VCAM-1 ELISA.

Beim Vergleich von gesunden Kontrolltieren am Tag 0 konnte jeweils eine signifikante Erhöhung der sVCAM-1-Plasmaspiegel zu den EAM-Mäusen an den Tagen 14, 21, 49 und 77 deutlich gemacht werden. Innerhalb der erkrankten Tiere konnte kein Unterschied der sVCAM-1-Level festgestellt werden ($p < 0,01$) (Abb.4-5).

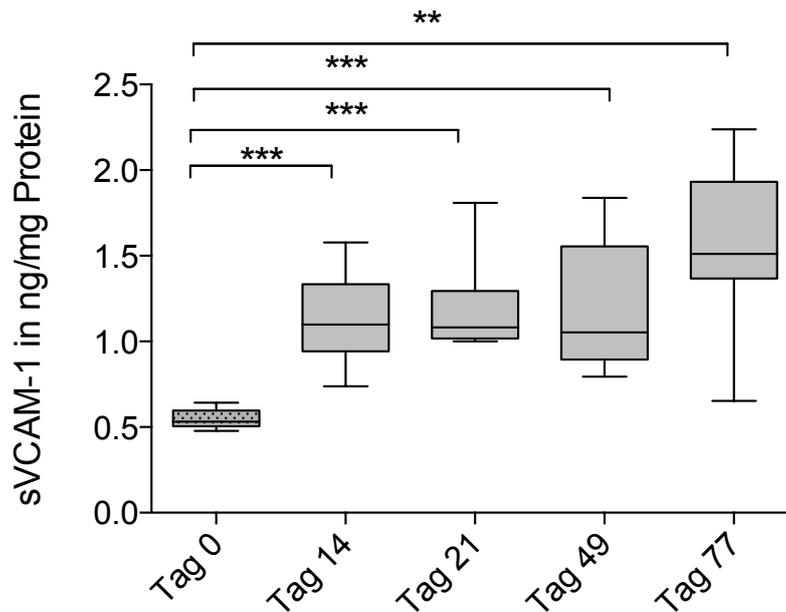


Abb. 4-5: Zeitreihe der sVCAM-1 Spiegel im murinen Plasma

Die Messung erfolgte mittels ELISA. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. Sterne zeigen die signifikanten Unterschiede. **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$, Tag 0: $n=6$, Tag 14, 21, 49: $n=12$

4.3.3. Fehlende Korrelation der sVCAM-1 Plasmalevel mit dem Grad der kardialen Leukozyteninfiltration an Tag 21

Um zu überprüfen, ob die sVCAM-1-Plasmalevel analog zum SLE sowie der rheumatoiden Arthritis auch im Rahmen der EAM einen Marker für die akute kardiale Entzündung darstellt, erfolgte die Korrelation mit dem EAM-Score [81, 104]. Der EAM-Score beschreibt dabei den Grad der Leukozyteninfiltration in das kardiale Gewebe analog zu Kapitel 3.3.8. Zwischen den sVCAM-1-Plasmalevel und dem EAM-Score zeigt sich an Tag 21 jedoch keine signifikante Korrelation ($r=0,324$, $p=0,39$) (Abb. 4-6).

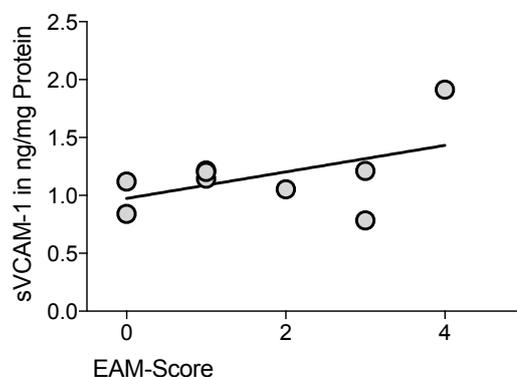


Abb. 4-6: Korrelation der murinen sVCAM-1-Plasmalevel mit dem EAM-Score an Tag 21

$r=0,324$, $p=0,39$, $n=9$

4.4. Histologische Evaluation der Inflammation nach VLA-4-Antikörpergabe

Wie anhand der Vorversuche gezeigt werden konnte, kommt es im Rahmen der EAM zu einer Überexpression von kardialem VCAM-1, einer verstärkten Ausschüttung seiner löslichen Form ins Blut sowie zu einer zunehmenden Einwanderung von VLA-4 positiven Zellen in das Myokard. In Folge dessen soll nun in den nachfolgenden Experimenten die Auswirkungen eines VLA-4-Antikörpers auf die kardiale Entzündung an Hand des EAM-Scores in Anhängigkeit von den Interventionszeitpunkten betrachtet werden.

Nach Antikörpergabe an Tag 7 zeigte sich im Vergleich zu unbehandelten Mäusen ein signifikant niedrigerer EAM-Score an Tag 21 ($p < 0,05$). Auch die Therapie zum Entzündungspeak an Tag 21 zeigte eine signifikante Abnahme der Entzündung an Tag 49 ($p < 0,05$). Die frühe Intervention mit Therapie an Tag 0 sowie Untersuchung der Tiere an Tag 14 konnte keinen signifikanten Rückgang der Infiltrate zeigen (Abb. 4-7).

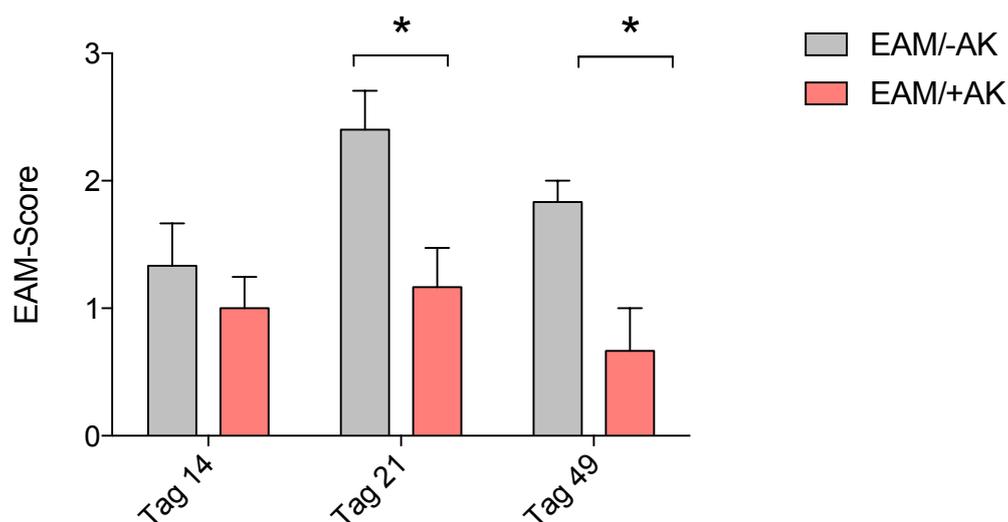


Abb. 4-7: Vergleich der myokardialen Entzündung von behandelten mit unbehandelten Tieren.

Die Auswertung der histologischen Schnitte erfolgte verblindet mit Hilfe des EAM-Scores. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. Sterne zeigen die signifikanten Unterschiede. *: $p < 0,05$, Tag 14 unbeh.: $n=6$, Tag 14 beh.: $n=12$, Tag 21 unbeh.: $n=10$, Tag 21 beh.: $n=6$, Tag 49 unbeh.: $n=6$, Tag 49 beh.: $n=6$

4.4.1. Evaluation der sVCAM-1-Plasmaspiegel nach VLA-4-Antikörpergabe

Um nachzuvollziehen, ob der eingesetzte VLA-4-Antikörper auch einen Einfluss auf die Plasmaspiegel des sVCAM-1 hat, wurde der Plasmaspiegel ebenfalls mit Hilfe des sVCAM-1 ELISA ermittelt. Die Mäuse wurden wiederum an den vier beschriebenen Zeitpunkten behandelt. Es konnte eine signifikante Reduktion der sVCAM-1-Plasmalevel in der frühen präventiven Gruppe an Tag 14 gezeigt werden ($p < 0,05$). Zu den späteren

Zeitpunkten, an Tag 21, 49 und 77 konnte kein relevanter Unterschied zwischen den Proteinmengen von behandelten zu unbehandelten Tieren nachgewiesen werden (Abb. 4-8).

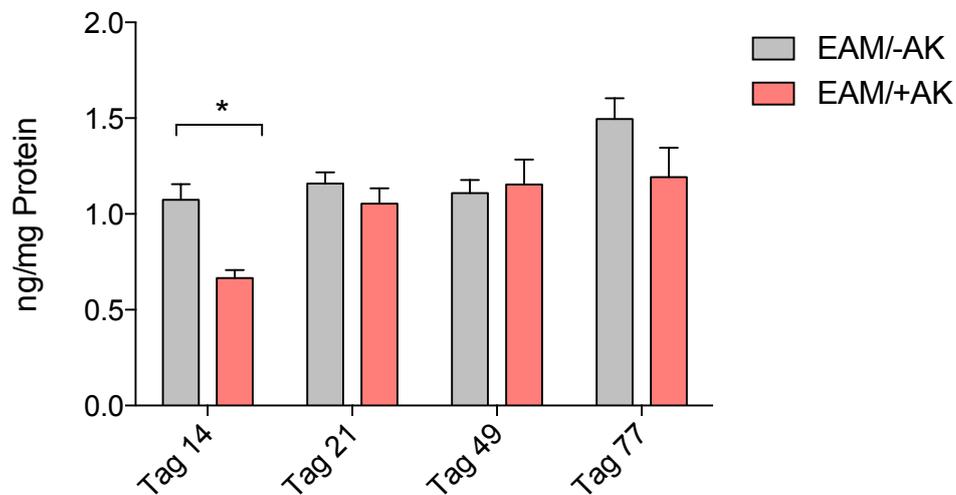


Abb. 4-8: Der Einfluss des VLA-4-Antikörpers auf die murinen sVCAM-1-Plasmalevel

Bestimmung der sVCAM-1-Plasmaspiegel mittels ELISA. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. Sterne zeigen die signifikanten Unterschiede. *: $p < 0,05$, Tag 14 unbeh.: $n=22$, Tag 14 beh.: $n=6$, Tag 21 unbeh.: $n=22$, Tag 21 beh.: $n=6$, Tag 49 unbeh.: $n=26$, Tag 49 beh.: $n=6$, tag 77 unbeh.: $n=20$, Tag 77 beh.: $n=6$

4.4.2. Evaluation der myokardialen Inflammation mittels FACS nach VLA-4-Antikörpergabe

Auf Grund der Zeitreihe der kardialen Entzündung in der HE-Färbung ist der deutlichste Effekt einer Intervention mit dem VLA-4-Antikörper an Tag 21 zu erwarten. Im Folgenden soll das entzündliche Infiltrat nun mittels FACS untersucht werden. Für die FACS-Versuche erfolgte die Antikörpergabe im akuten Entzündungsstadium an Tag 21 bis zum Tag der Messung an Tag 49.

Die Intervention im akuten Stadium zeigt wie erwartet bei allen untersuchten Zellen eine signifikante Reduktion der prozentualen Zellzahl

Der Anteil myokardialer VLA4⁺/CD45⁺ Zellen wird vier Wochen nach VLA-4-Antikörpergabe deutlich reduziert (10(±7,7)% auf 0,62(±0,27)% nach Antikörpergabe, ($p < 0,01$), Abb. 4-9a). Die Abbildung 4-10 zeigt beispielhaft die FACS-Scattergramme VLA-4/CD45 positiver Zellen.

Nach Intervention Tag 21 zeigt sich wie zu erwarten an Tag 49 ebenfalls eine signifikante Reduktion der CD45⁺/CD4⁺ T-Helferzellen (0,98(±0,4)% auf 0,40(±0,29)% nach

Antikörpergabe, ($p < 0,01$), Abb.4-9b). Die Abbildung 4-11 zeigt ein Beispiel eines FACS-Scattergrammes von $CD45^+/CD4^+$ T-Helferzellen.

Nach Antikörpergabe zeigt sich ebenfalls eine signifikante Reduktion der $CD4^+/CD25^+/FoxP3$ T-regulatorischen Zellen ($1,45(\pm 0,49)\%$ auf $0,11 (\pm 0,09)\%$ nach VLA-4-Antikörpergabe, ($p < 0,01$), Abb. 4-9c).

Zuletzt zeigte sich nach Antikörpertherapie auch der Anteil myokardialer $CD45^+/Prom-1^+$ Progenitorzellen an Tag 49 deutlich reduziert ($4,5(\pm 1,57) \%$ auf $0,87(\pm 0,38)\%$ nach Antikörpergabe, ($p < 0,01$), Abb. 4-9d).

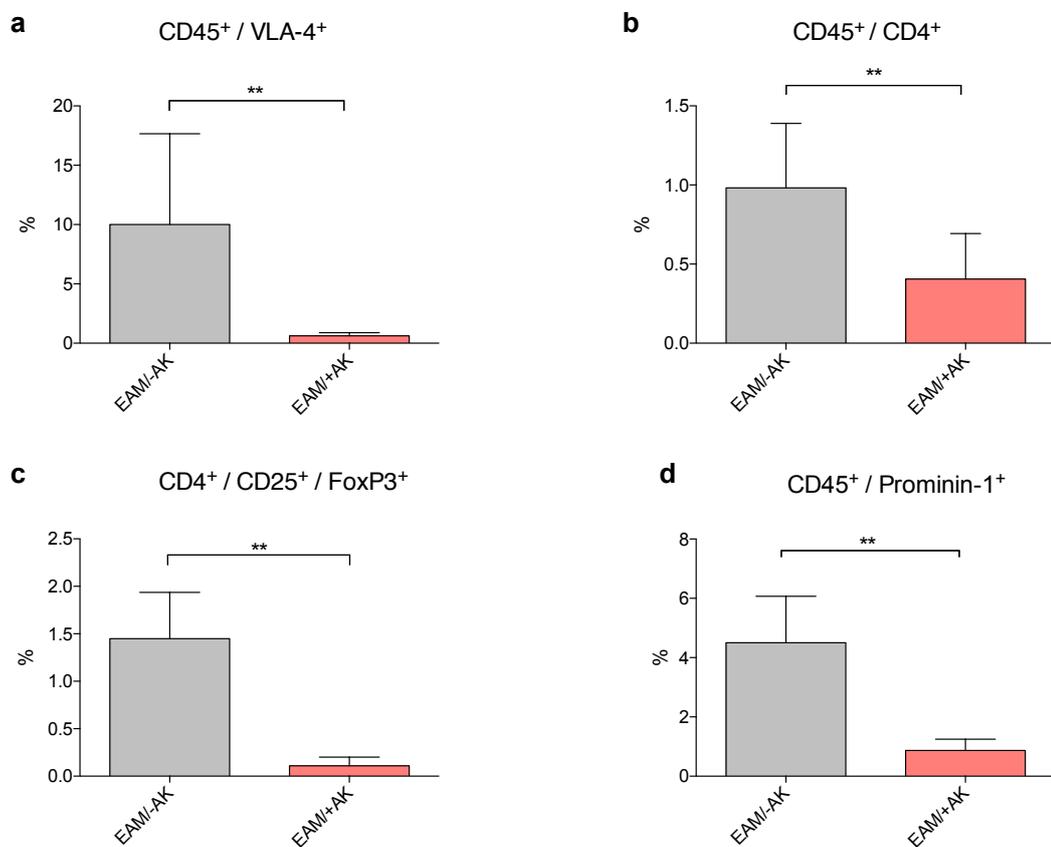


Abb. 4-9: Die prozentuale Verteilung der intrakardialen Entzündungszellen mit und ohne Antikörpertherapie an Tag 49.

Bestimmung mittels Durchflusszytometrie. Die Behandlung mit dem VLA-4-Antikörper erfolgte im akuten Stadium an Tag 21. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. Sterne zeigen die signifikanten Unterschiede. **: $p < 0,01$, unbeh.: $n=6$, beh.: $n=5$

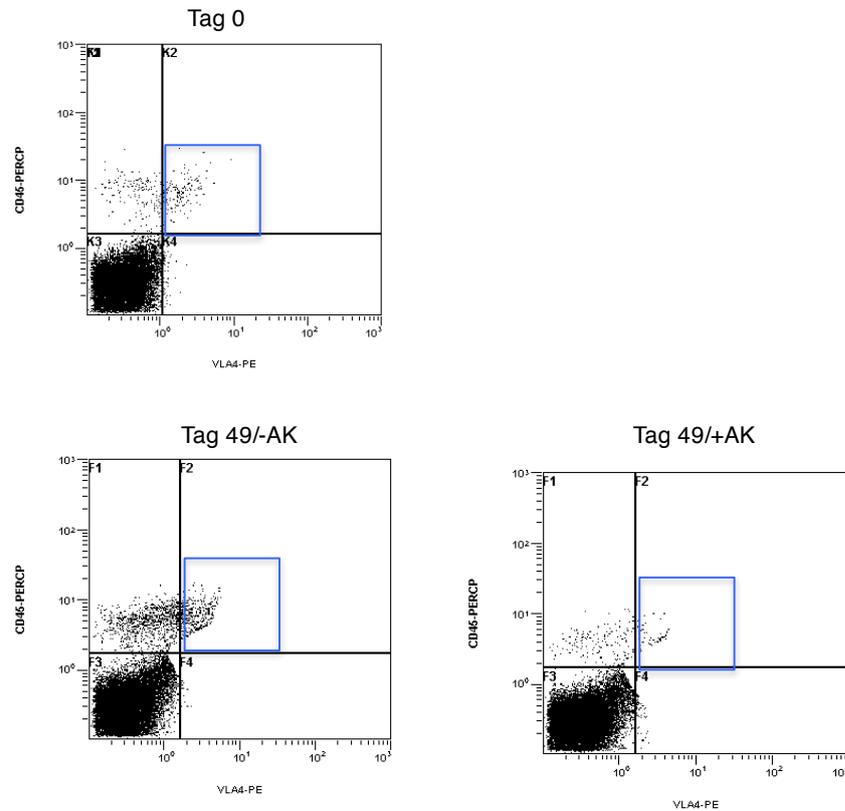
CD45⁺ / VLA-4⁺

Abb. 4-10: FACS-Scattergramme von Myokard infiltrierenden CD45⁺/VLA-4⁺ Zellen

Auf der Abszisse sind die VLA-4⁺ Zellen aufgetragen, auf der Ordinate die CD45⁺ Zellen. Die obere Abbildung an Tag 0 zeigt ein gesundes unbehandeltes Tier. Die untere rechte Abbildung beschreibt ein erkranktes Tier an Tag 49 ohne Antikörpertherapie, die linke Abbildung zeigt ein Tier an Tag 49 mit Antikörpertherapie. Die doppelt positiven Zellen sind mit dem blauen Rahmen hervorgehoben. In den beiden unteren Abbildungen wird ersichtlich, dass der Anteil der VLA-4⁺/CD45⁺ Zellen durch die Therapie deutlich reduziert wird und weniger Entzündungszellen in das Herzgewebe einwandern.

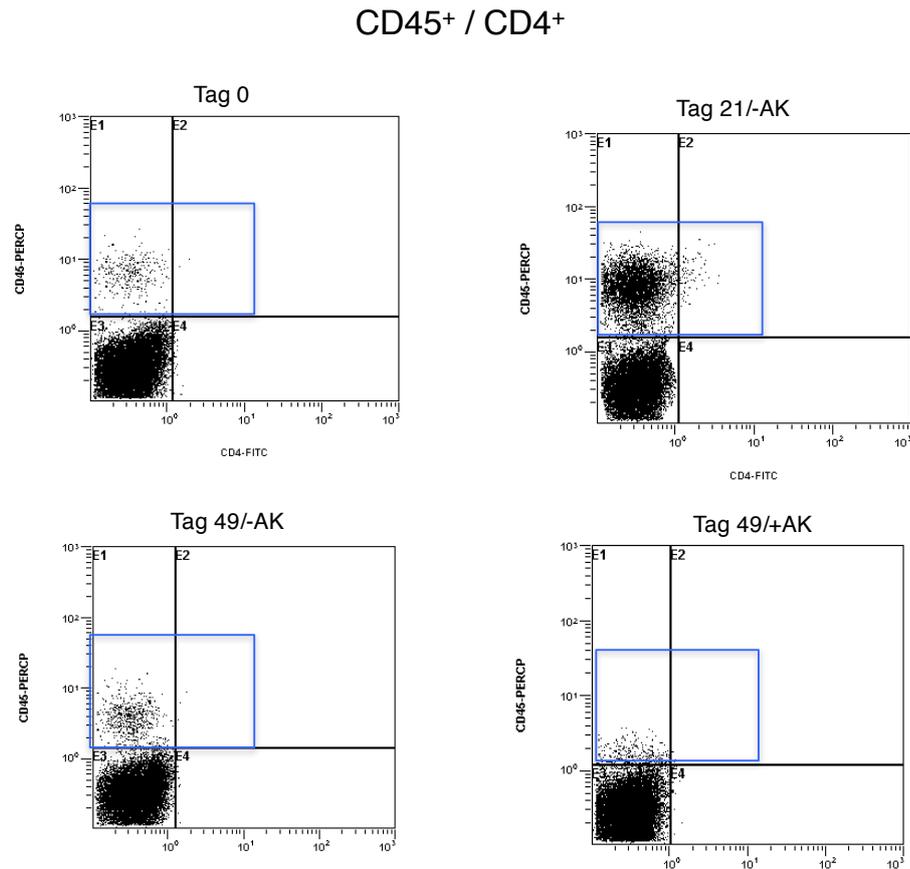


Abb. 4-11: *FACS-Scattergramm von Myokard infiltrierenden CD45⁺/CD4⁺ T-Helferzellen*

Auf der Abszisse sind die CD4⁺ Zellen aufgetragen, auf der Ordinate die CD45⁺Zellen. Die obere Abbildung an Tag 0 zeigt die ein gesundes unbehandeltes Tier. Die untere rechte Abbildung beschreibt ein erkranktes Tier an Tag 49 ohne Antikörpertherapie, die linke Abbildung zeigt ein Tier an Tag 49 mit Antikörpertherapie. Die doppelt positiven Zellen sind mit dem blauen Rahmen hervorgehoben. In den beiden unteren Abbildungen wird ersichtlich, dass der Anteil der CD4⁺/CD45⁺ Zellen durch die Therapie deutlich reduziert wird und weniger Entzündungszellen in das Herzgewebe einwandern.

4.5. Auswirkung des VLA-4-Antikörpers auf die kardiale Fibrose im Rahmen der EAM

Die Darstellung der Fibroseausprägung erfolgte mit Hilfe der morphometrischen Auswertung der Masson-Trichrom-Färbung muriner Herzen. Da das kardiale Remodeling und die Fibroseentwicklung erst im chronischen Stadium ab Tag 30 zu erwarten ist [65], wurden nun gezielt Tiere an Tag 49 miteinander verglichen.

Dabei zeigen die Mäuse, die im akuten Entzündungsstadium an Tag 21 eine VLA-4-Antikörpertherapie erhalten, eine deutlich geringere prozentuale Fibrosierungsrate im Vergleich zu unbehandelten Tieren. Der Mittelwert des Fibroseanteils an der kardialen

Gesamtfläche der unbehandelten Tiere lag dabei bei $1,74 (\pm 0,95)\%$, bei den behandelten bei $0,6 (\pm 0,52)\%$ ($p < 0,05$) (Abb. 4-12).

Die histologische Abbildung 4-13 eines Masson-Trichrom gefärbten Herzschnittes zeigt beispielhaft die kardiale Fibrosierung eines unbehandelten Tieres an Tag 49.

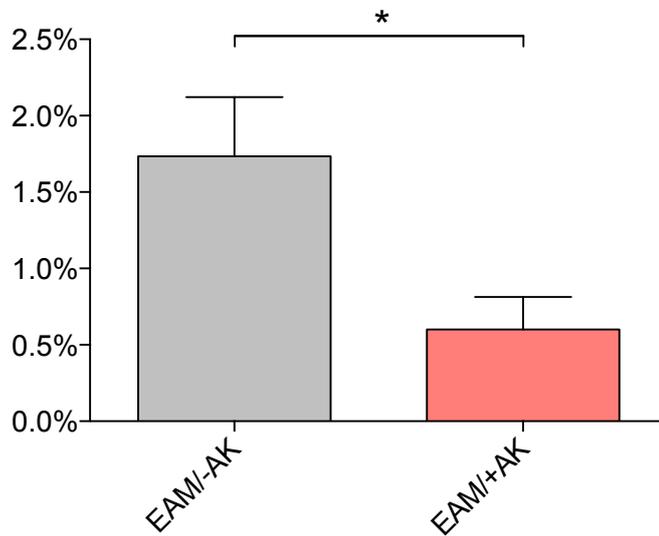


Abb. 4-12: Einfluss des VLA-4-Antikörpers auf den Fibroseanteil des murinen Herzens an Tag 49

Verglichen wird die Fibroseausprägung von Tieren an Tag 49, die an Tag 21 mit dem VLA-4-Antikörper behandelt wurden, mit unbehandelten Kontrollen. Dargestellt wird die prozentuale Fibrosefläche in Bezug auf die kardiale Gesamtfläche. Die Auswertung der Masson-Trichrom-Schnitte erfolgte morphometrisch. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. Sterne zeigen die signifikanten Unterschiede. *: $p < 0,05$, $n=6$

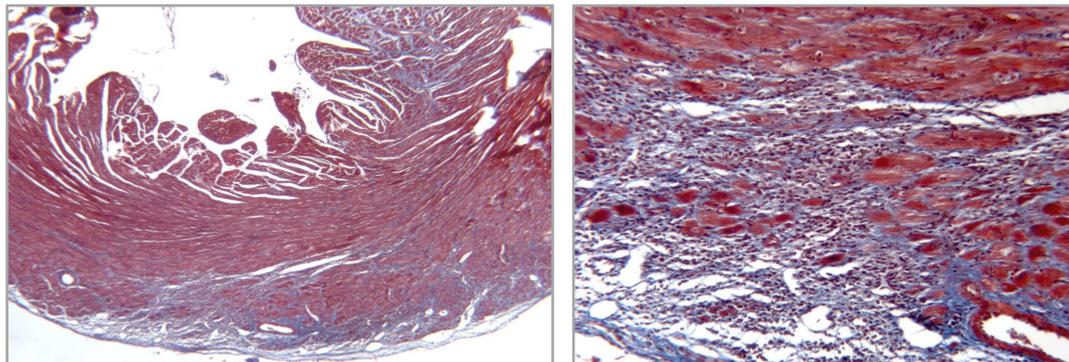


Abb. 4-13: Histologischer Schnitt von dem linken Ventrikel einer im chronischen Stadium erkrankten Maus an Tag 49.

Sichtbar ist eine hochgradige epi- und myokardiale Fibrose. Masson-Trichrom-Färbung, Linke Abbildung 10x vergrößert, rechte Abbildung 2,5x vergrößert.

4.6. PET-Untersuchung der Herzfunktion von EAM-Mäusen

Nach Darstellung der histologischen und zellulären Veränderung der experimentellen Autoimmunmyokarditis sollen die Auswirkung der EAM auf die kardiale Funktion untersucht werden. Die Bestimmung der murinen Herzfunktionsparameter konnte in Zusammenarbeit mit der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin der Ludwigs-Maximilians-Universität unter Verwendung eines Tier-Positronen-Emissions-Tomographen verwirklicht werden.

4.6.1. Bestimmung der Herzfunktionsparameter nach Antikörperintervention im akutem Stadium der EAM

Nach Immunisierung an Tag 0 und 7 erfolgte zunächst die Bestimmung der Herzfunktion mittels PET an Tag 21 unmittelbar vor Antikörpergabe. Die zweite Bestimmung fand vier Wochen später, an Tag 49, nach Intervention mit dem VLA-4-Antikörper oder NaCl in der Kontrollgruppe statt.

4.6.1.1 Ausbleibende Reduktion der Ejektionsfraktion im chronischen Stadium nach Antikörperintervention im akutem Stadium

Im akuten Entzündungsstadium an Tag 21 zeigt sich mit einer durchschnittlichen Ejektionsfraktion (EF) von $64(\pm 6)\%$ keine Einschränkung der Pumpfunktion [98]. An Tag 49 zeigt sich eine signifikante Reduktion der EF bei den unbehandelten Tieren ($64(\pm 6)\%$ an Tag 21, $55(\pm 5)\%$ an Tag 49, $p < 0.001$, Abb. 4-14).

Die EF der Tiere, die mit dem VLA-4-Antikörper behandelt wurden, zeigten keine signifikante Reduktion der Pumpfunktion ($57,5(\pm 6)\%$, $p > 0.05$) im Vergleich zu Tag 21. Allerdings war der Unterschied zwischen den Gruppen an Tag 49 nicht signifikant ($55(\pm 5)\%$, an Tag 49 unbeh., $57,5(\pm 6)\%$, an Tag 49 beh., $p > 0.05$, Abb. 4-14).

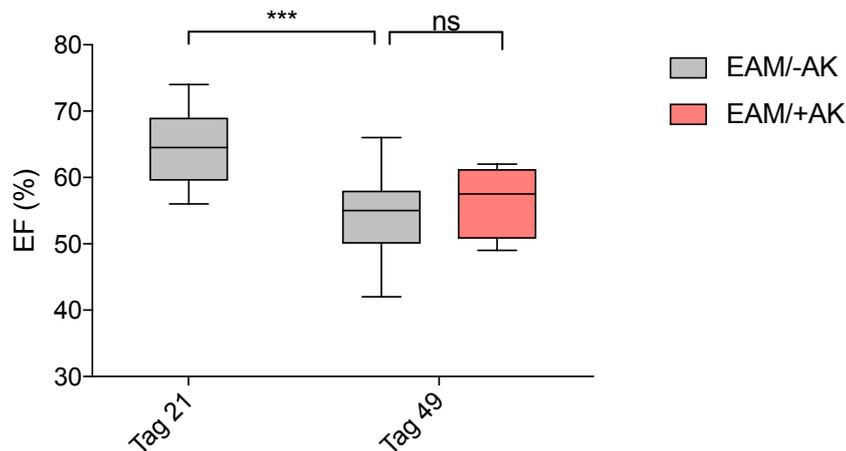


Abb. 4-14: Darstellung der EF an Tag 49 von behandelten und unbehandelten Tieren.

Die Immunisierung und die Intervention mit dem VLA-4-Antikörper erfolgten wie oben beschrieben. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an. ***: $p < 0,001$, Tag 21 unbeh.: $n=8$, Tag 49 unbeh.: $n=19$, Tag 49 beh.: $n=4$

4.6.1.2 Bestimmung von EDV und ESV im chronischen Stadium nach Antikörperintervention im akutem Stadium der EAM

Sowohl bei der Messung des enddiastolischen Volumens [105] als auch des endsystolischen (ESV) Volumens kommt es zu einer signifikanten Zunahme der Volumina zwischen Tag 21 und Tag 49. Zwischen unbehandelten und behandelten Tieren ist kein Unterschied der Volumina zu erkennen (Abb. 4-15).

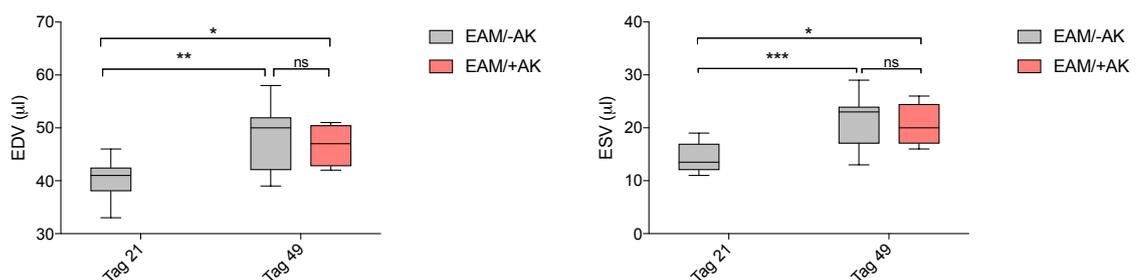


Abb. 4-15: Darstellung von EDV und ESV an Tag 21 und an Tag 49 mit und ohne Antikörperintervention.

Die Immunisierung und die Intervention mit dem VLA-4-Antikörper erfolgten wie oben beschrieben. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an. ***: $p < 0,001$, **: $p < 0,01$, *: $p < 0,05$, Tag 21 unbeh.: $n=8$, Tag 49 unbeh.: $n=19$, Tag 49 beh.: $n=4$

4.6.2. Korrelation der sVCAM-1-Level mit der kardialen Herzfunktion im chronischen Stadium der EAM

Um zu überprüfen, ob sVCAM-1 möglicherweise als Marker für die kardiale Dilatation oder als Marker für die myokardiale Kontraktilität fungiert, erfolgte eine Korrelation mit dem EDV und der LVEF im chronischen Stadium.

In der statistischen Analyse zeigte sich zwischen dem EDV sowie den sVCAM-1-Level im Plasma keine signifikante Korrelation ($r=0,035$, $p=0,963$). Das EDV dient hier als Surrogatparameter für die kardiale Dilatation [106] (Abb. 4-16a).

Im Vergleich des kardialen Funktionsparameter LVEF mit den sVCAM-1-Level im Plasma zeigt sich eine moderate, jedoch nicht signifikante Korrelation ($r=-0,468$, $p=0,291$) (Abb. 4-16b) Die LVEF beschreibt dabei als Surrogatparameter die myokardiale Kontraktilität [107].

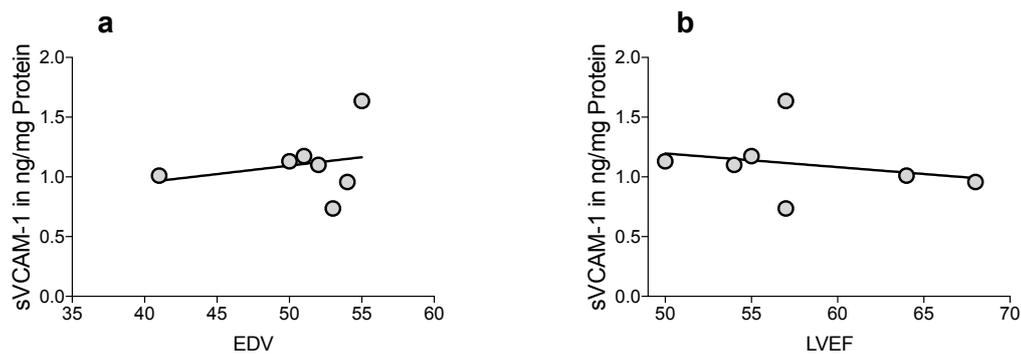


Abb. 4-16: Korrelation von sVCAM-1-Level an Tag 49 mit a) dem EDV und b) der LVEF.

a) $r=0,035$, $p=0,963$, $n=7$, b) $r=-0,468$, $p=0,291$, $n=7$

5. DISKUSSION

Die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war es, die Rolle der Blockade der VCAM-1/VLA-4-Achse durch einen monoklonalen VLA-4-Antikörper für die EAM zu evaluieren. Durch diese Behandlung sollte entsprechend der Hypothese eine verminderte Migration von Entzündungszellen und somit eine Reduktion der akuten kardialen Inflammation erzielt werden. Weitergehend war ein positiver Einfluss auf das kardiale „Remodeling“ und die Pumpfunktion angestrebt.

Die wesentlichen Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

Im Rahmen der EAM kommt es sowohl zu einer Hochregulation von kardialem VCAM-1 als auch von sVCAM-1 im Blutplasma.

Eine Korrelation von sVCAM-1 kann jedoch weder mit der murinen Herzfunktion noch mit der akuten myokardialen Entzündung nachgewiesen werden.

Mittels Durchflusszytometrie konnte die Infiltration von verschiedenen Leukozytensubpopulationen in das murine Herzgewebe über den zeitlichen Verlauf der EAM darstellt werden.

Die Inhibition der VCAM-1/VLA-4-Achse hatte sowohl eine Reduktion der histologischen Entzündungsinfiltrate als auch eine quantitative Reduktion der Leukozytensubpopulationen im akuten Stadium zur Folge.

Das Verabreichen des VLA-4-Antikörpers führt zu einer Reduktion der kardialen Fibrose im chronischen Stadium der EAM.

Durch die Blockade der VCAM-1/VLA-4-Achse zeigt sich ein Trend zur Verbesserung der kardialen Pumpfunktion im chronischen Stadium.

5.1. Die Aktivierung der VCAM-1/VLA-4-Achse bei der EAM

In der vorliegenden Arbeit konnte mittels ELISA gezeigt werden, dass kardiales VCAM-1 (cVCAM-1) sowohl im akuten als auch im chronischen Stadium der EAM im murinen Herz signifikant hochreguliert wird (Abb. 4-4). Diese Ergebnisse stellen sich analog zu den Daten von Eriksson et al. [103] dar, die eine immunhistologische Überexpression von

cVCAM-1 dokumentieren konnten. Eine Zunahme der Expression von cVCAM-1 ließ sich in Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe auch im Cocksackie-Virus induziertem Myokarditismodell nachweisen [108]. Theiss et al. beschreibt darüber hinaus eine Überexpression von humanem cVCAM-1 bei Patienten mit einer iDCM. Im Vergleich dazu zeigen Patienten mit DCM ohne inflammatorische Komponente eine deutlich verminderte Expression von cVCAM-1 [109]. Folglich lässt sich die VCAM-/VLA-4-Achse nicht nur durch eine virale Infektion aktivieren. Eine Entzündungsreaktion, unabhängig von dem zugrundeliegenden Pathomechanismus erscheint ausreichend.

Erstmals konnte darüber hinaus in dieser Arbeit dargelegt werden, dass die sVCAM-1-Spiegel im murinen Plasma bei der EAM im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren signifikant erhöht sind (Abb. 4-5). Dies bestätigt zum einen erneut die Aktivierung der VCAM-1/VLA-Achse im Rahmen der EAM, zum anderen lässt es auf einen Einsatz als Biomarker für die Krankheitsausprägung der iDCM in der Humanmedizin hoffen. Dass das humane sVCAM-1 bei Autoimmunerkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis oder dem SLE ebenfalls hochreguliert wird und als Biomarker für die Krankheitsaktivität fungiert, ist bekannt [81] [110]. Um zu überprüfen, ob sVCAM-1 analog zu diesen Ergebnissen als Marker für die Krankheitsaktivität der EAM eingesetzt werden kann, erfolgte der Vergleich der akuten myokardialen Entzündung an Tag 21 und den sVCAM-1-Level im Plasma [81, 111]. Eine Korrelation konnte jedoch nicht gezeigt werden (Abb. 4-6). Innerhalb der Gruppe der erkrankten Tiere konnten zu den verschiedenen akuten und chronischen Untersuchungszeitpunkten keine Unterschiede der sVCAM-1-Spiegel nachgewiesen werden (Abb. 4-5). Auch die Therapie mit dem VLA-4-Antikörper Natalizumab konnte keinen Einfluss auf die sVCAM-1-Spiegel zeigen. Außer an Tag 14 konnte zwischen behandelten und unbehandelten Tieren kein Unterschied der sVCAM-1-Level im Plasma festgestellt werden (Abb. 4-8). Dies bestärkt ebenfalls den Verdacht, dass sVCAM-1 im murinen Plasma nicht mit der Krankheitsaktivität der EAM korreliert.

Von besonderem Interesse im Hinblick auf einen möglichen Einsatz in der Humanmedizin erschien darüber hinaus eine Korrelation von sVCAM-1 mit der murinen Herzfunktion. Zwischen der LVEF, die ein Maß für die kardiale Kontraktilität darstellt, und dem sVCAM-1-Spiegel zeigt sich eine geringfügige Korrelation. Diese ist jedoch nicht signifikant (Abb. 4-16b) [107]. Eine Korrelation zwischen sVCAM-1 und dem EDV, welches die kardiale Dilatation im chronischen Stadium beschreibt, kann nicht bestätigt werden (Abb. 4-16a) [73, 102, 112].

Darüber hinaus wurde in nachfolgenden Arbeiten unserer Arbeitsgruppe weitere Marker für den Schweregrad der Entzündung mit den sVCAM-1 Level korreliert. Auch die kardiale Expression des proinflammatorischen Zytokin IL-6 und des profibrotischen TGF- β , die beide von wesentlicher Bedeutung für die Pathogenese der EAM sind, standen nicht mit der Höhe der sVCAM-1-Level in Zusammenhang [102, 103, 113].

Ein Einsatz von sVCAM-1 als Biomarker für die iDCM im chronischen Stadium der EAM ist an Hand der vorliegenden Daten nicht realisierbar. Obwohl eingeschränkt eine positive, jedoch nicht signifikante Korrelation zwischen den sVCAM-1-Plasmaspiegeln und der kardialen Kontraktilität im chronischen Stadium gezeigt werden konnte, lässt sich eine positive Korrelation der sVCAM-1-Spiegel mit dem Grad der myokardialen Entzündung im akuten Stadium derzeit nicht bestätigen.

5.2. Infiltration von Leukozytensubpopulationen

Bei der EAM kommt es ca. 21 Tage nach der ersten Immunisierung zu einem Infiltrationsmaximum von Entzündungszellen in das Myokard. Dies konnte in der vorliegenden Arbeit analog zu den Ergebnissen von Afanasyeva et al. und anderen Vorarbeiten zunächst durch Auswertung der histologischen Schnitte mit Hilfe des EAM-Scores beschrieben werden [5, 65, 99]. Im chronischen Stadium kommt es zu einem deutlichen Rückgang der Entzündungsinfiltrate und im Verlauf zu einer Zunahme des kardialen Remodelings (Abb. 4-2). Die zelluläre Komponente der Entzündungsinfiltrate besteht vorrangig aus T-Lymphozyten, Monozyten und Makrophagen [9, 114].

Aus klinischen Studien ist bekannt, dass allein über die akute myokardiale Infiltration keine Aussage über den späteren Outcome der kardialen Funktion getroffen werden kann. Beispielhaft kann in der Humanmedizin die fulminante Form der lymphozytären Myokarditis genannt werden, die in der akuten Phase mit einer massiven Verschlechterung der Herzfunktion bis hin zum kardiogenen Schock einhergehen kann. Nichtsdestotrotz kommt es bei über 70% der Patienten zu einer spontanen Remission ohne Zurückbleiben von Residuen [10]. In Folge dessen wurden mit Hilfe der Durchflusszytometrie weitere Leukozytensubpopulationen untersucht, die für die Entstehung der EAM und in Folge der iDCM pathognomonisch sind.

Vor allem T-Helferzellen sind für die Entstehung der EAM elementar und stellen einen Marker für die Progression und für die kardiale Dysfunktion dar [5]. Die Infiltration von T-Zellen findet dabei im Allgemeinen zu einem frühen Zeitpunkt der Entzündung statt, löst in Folge eine Immunantwort aus und dient somit der Rekrutierung weiterer

Entzündungszellen [115]. Die kardiale Infiltration von CD45⁺/CD4⁺ T-Helferzellen beginnt bei der EAM um den Tag 14 nach Immunisierung und zeigt an Tag 21 ihr Maximum. Der Anteil an CD45⁺/CD4⁺ Zellen bleibt auch im chronischen Stadium weiterhin erhöht. Dies spricht für eine persistierende Aktivierung des Immunsystems im Verlauf der EAM (Abb. 4-3b).

CD4⁺/CD25⁺/FoxP3 T-regulatorische Zellen gehören ebenfalls zu den T-Helferzellen, die eine entscheidende Rolle beim Krankheitsverlauf der EAM spielen. Indem T-regulatorische Zellen die Immunantwort modulieren, sind sie maßgeblich an der Entwicklung der Immuntoleranz beteiligt. CD4⁺/CD25⁺T-regulatorische Zellen sind in der Lage T-Helferzellen so zu kontrollieren, dass diese zwischen fremden und eigenen Antigenen unterscheiden lernen [9]. Im Verlauf der EAM kommt es erwartungsgemäß zur Infiltration von CD4⁺/CD25⁺/FoxP3 T-regulatorischen Zellen in das Myokard. Auch hier wird erneut das postulierte Entzündungsmaximum an Tag 21 durch den prozentual größten Anteil T-regulatorischer Zellen bestätigt. Auch im chronischen Stadium kann die Aktivierung des Immunsystems durch die weiterhin erhöhte Anzahl CD4⁺/CD25⁺/FoxP3 T-regulatorischer Zellen im Vergleich zu gesunden Tieren an Tag 49 und an Tag 77 gezeigt werden (Abb. 4-3c).

Dass es im Rahmen der EAM zu einer Aktivierung der VCAM-1/VLA-4-Achse kommt, hat sich bereits durch die Hochregulation des cVCAM-1 sowie des sVCAM-1 im Plasma erwiesen. Der Bindungspartner von VCAM-1 ist VLA-4 (Very-Late-Antigen-4), ein Zelloberflächenrezeptor, der auf Lymphozyten, Monozyten, aktivierte T-Zellen und Eosinophilen während einer Entzündungsreaktion exprimiert wird [76]. Das $\alpha 4\beta 1$ Integrin (VLA-4) ist in der Lage transmembranal Signale in das Zellinnere zu senden und somit Adhäsion, Migration, Proliferation und Zytokinsekretion zu modifizieren [76]. Wird VLA-4 auf T-Zellen exprimiert, können diese Antigen-abhängig über CD3 aktiviert werden. Dies führt wiederum zur T-Zell Proliferation und Regulation der Zytokinproduktion [116]. Es ist bereits bekannt, dass dieser Pathomechanismus bei der Pathogenese der Multiplen Sklerose und auch bei der des Morbus Crohn eine entscheidende Rolle spielt [93] [94]. Im akuten Stadium der EAM kommt es zu einer signifikanten Zunahme von intrakardialen CD45⁺/VLA-4⁺ Leukozyten im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren. Nachweislich ergab sich im chronischen Stadium an Tag 77 wiederum eine signifikante Abnahme der prozentualen Zellzahl. Das bestätigt, dass es sich bei der Aktivierung der VCAM-1/VLA-4-Achse um einen Mechanismus der akuten Entzündungsreaktion handelt (Abb. 4-3a).

Nach Kania et al. wirken bei dem Prozess des kardialen Remodelings bei der Myokarditis unter anderem aus dem Knochenmark einwandernde Progenitorzellen maßgeblich mit [101]. Prominin-1 stellt dabei einen Marker dar, der von den Progenitorzellen exprimiert wird. Diese wandern im Rahmen der EAM in das Myokard ein und beteiligen sich am kardialen Remodeling, indem sie unter Einfluss von TGF- β zu Fibroblasten ausdifferenzieren. Der Nachweis von Prominin-1 während der akuten Entzündungsphase stellt somit einen prognostischen Marker für die myokardiale Fibrosierung im chronischen Stadium dar [102]. Analog dazu konnte in dieser Arbeit nachgewiesen werden, dass es im akuten Stadium der EAM an Tag 21 zu einem Höhepunkt der Migration von CD45⁺/Prominin-1⁺ Leukozyten ins kardiale Gewebe kommt (Abb. 4-3d).

5.3. Der VLA-4-Antikörper als neuer therapeutischer Ansatz der EAM

Die EAM hat als Myokarditismodell maßgeblich zum aktuellen Verständnis der zu Grunde liegenden Pathomechanismen der inflammatorischen Herzerkrankungen beigetragen. Genau wie die experimentelle Autoimmunenkephalitis (EAE), ein Modell für die Multiple Sklerose, ist die EAM eine CD4⁺ gesteuerte Autoimmunerkrankung. Bei beiden Modellen kann die Autoimmunreaktion entweder durch einen passiven Transfer von aktivierten T-Zellen oder durch mit Peptiden bestückten dendritischen Zellen hervorgerufen werden [117] [9] [72]. Eine weitere Möglichkeit, welche ebenfalls in dieser Arbeit durchgeführt wurde, liegt in der aktiven Immunisierung mit körpereigenen Peptiden.

Forschungsstudien im Rahmen der EAE haben bewiesen, dass durch eine Blockade der alpha4 Untereinheit von VLA-4 mittels Antikörper die Leukozytenmigration in das Zentralnervensystem (ZNS) inhibiert wird und die Mäuse so vor einer Erkrankungsausprägung geschützt werden können [118, 119]. Darüber hinaus reduziert der VLA-4- Antikörper auch nach Krankheitsbeginn die Symptome der Multiplen Sklerose und vermindert die Leukozytenzahl im ZNS [117]. Nachgewiesenermaßen wird die Zahl der CD4⁺/CD8⁺ T-Zellen und CD19⁺ B-Zellen im Liquor nach Antikörperbehandlung mit VLA-4-Antikörper Natalizumab deutlich reduziert [120]. Außer der Barrierefunktion scheint es aber noch weitere Mechanismen zu geben, über die Natalizumab wirken kann und die bis heute nicht eindeutig geklärt sind. Hierbei wird vor allem der Einfluss auf Chemokine und Cytokine, aber auch auf die Genexpression der B- und T-Zellen diskutiert [121-123]. Die Behandlung der Multiplen Sklerose mit dem VLA-4-Antikörper Natalizumab wurde folglich zu einem Meilenstein der Therapie [93, 124].

In dieser Arbeit wurden nun erstmals die Auswirkungen des VLA-4-Antikörpers auf die Entwicklung der EAM untersucht. Um den Phänotyp nach Antikörpergabe zu evaluieren, wurden zuerst HE-Färbungen zum EAM-Scoring sowie FACS-Untersuchungen zum quantitativen Nachweis von C45+/VLA-4+ Zellen durchgeführt. Hier zeigte sich nach der Antikörpergabe sowohl eine Reduktion des histopathologischen Scores als auch eine Reduktion von VLA-4+ Zellen. Der reduzierte Phänotyp nach Einsatz des VLA-4-Antikörpers kann als Hinweis für die Wirksamkeit des Antikörpers im EAM Mausmodell dienen (Abb.4-7) (Abb. 4-9a).

Erfolgt eine Antikörpertherapie mit dem VLA-4-Antikörper zeitgleich mit der zweiten Immunisierung an Tag 7, ergibt sich bei der histologischen Untersuchung an Tag 21 eine deutliche Reduktion der Entzündungsinfiltrate. Wird der VLA-4-Antikörper zeitgleich mit der ersten Immunisierung verabreicht, besteht an Tag 14 kein Unterschied in der Entzündungsausprägung (Abb. 4-7). Erfolgt zum Entzündungsmaximum an Tag 21 eine Antikörpertherapie der EAM, zeigt sich an Tag 49 eine signifikante Reduktion der Entzündungsinfiltrate (Abb. 4-7). Dies lässt rückschließen, dass der Antikörper auch im Rahmen der EAM in der Lage ist die Immigration von Entzündungszellen in das kardiale Gewebe zu unterdrücken. Eine Supprimierung der primären Autoimmunreaktion durch den Antikörper scheint jedoch nicht möglich. Um die zugrundeliegenden Wirkmechanismen zu verstehen, wurden die akuten kardialen Entzündungsinfiltrate erneut mit Hilfe der Durchflusszytometrie qualitativ weiter analysiert. Vergleicht man behandelte und unbehandelte Tiere, ist eine quantitative Reduktion aller untersuchten Leukozytensubpopulationen durch die Antikörpertherapie im akuten Stadium offensichtlich (Abb.4-9).

Analog dazu kommt es nach Antikörpergabe auch zu einer signifikanten Reduktion von CD4⁺/CD25⁺/FoxP3 Zellen im myokardialen Gewebe im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. 4-9c). Welche Rolle T-regulatorische Zellen im Rahmen der Autoimmunmyokarditis spielen, ist aktuell noch nicht abschließend geklärt. Verschiedene wissenschaftliche Arbeiten lassen vorrangig einen protektiven Effekt auf die myokardiale Entzündung im Rahmen der EAM erkennen. Die Hochregulation von CD4⁺/CD25⁺/FoxP3 im Rahmen der Myokarditis kann mit einer verminderten Erkrankungsausprägung, einer reduzierten Entzündung und einer abgeschwächten Progression der Erkrankung korreliert werden [125] [5] [9]. Darüber hinaus konnte bei Patienten mit einer DCM gezeigt werden, dass T-regulatorische Zellen einen protektiven Effekt auf die Entwicklung einer iDCM haben, indem sie die dominante CD4⁺-T-Zell-Antwort unterdrücken [126]. Huber et al. konnte in Folge darlegen, dass die Reduktion von CD4⁺-T-Zellen durch eine verminderte kardi-ale Inflammation die Progression zur DCM im Mausmodell unterdrückt. Durch einen

adoptiven Transfer von T-regulatorischen Zellen im TNF1.6 Mausmodell kann eine Verbesserung der vorbestehenden DCM mit vermindertem Herzgewicht und reduzierten Troponin T Serumspiegeln nachgewiesen werden [127]. Eine weitere interventionelle Arbeit konnte auch bei der Autoimmunmyositis durch Transfer von T-regulatorischen Zellen eine Reduktion von Entzündungsinfiltraten im Mausmodell darstellen [128].

Kontrovers dazu sind die Daten von Xie et al., die im CVB3 Myokarditismodell zeigen, dass eine persistierende Aktivierung von T-regulatorischen Zellen in der Lage ist, die Funktion von zytotoxischen anti-viralen CD4⁺ und CD8⁺ Zellen zu inhibieren. Auf diese Weise wird eine Viruspersistenz möglich und die Entstehung der Myokarditis gefördert [70]. In-vivo-Daten zeigen auch, dass die antiinflammatorische Funktion der T-regulatorischen Zellen stark von der Interaktion mit anderen Immunzellen, mit Pathogenen und mit der zugrundeliegenden pathophysiologischen Kondition des Organismus abhängig ist [69].

Abschließend lässt sich sagen, dass durch die unselektive Hemmung der Immigration von T-regulatorischen Zellen und ggf. weiteren nicht untersuchten antiinflammatorischen Zellen durch den VLA-4-Antikörper positive immunmodulatorische Einflüsse unterdrückt werden können. Dies kann eine Erklärung für die im Verhältnis nur schwach ausgeprägte Verbesserung des Phänotyps in dieser Arbeit darstellen. Beispielhaft zu nennen sind hier die nur unwesentliche Verbesserung der Pumpfunktion nach Antikörpergabe sowie der nur eingeschränkte Einfluss des Antikörpers auf die murine Herzfunktion. Da allerdings aktuell die detaillierten molekularen Wirkmechanismen dieser protektiven Effekte der T-regulatorischen Zellen nicht bekannt sind, bedarf es zunächst weitere Forschungsarbeiten um dies vollständig zu beantworten [129].

5.4. Reduktion der Progression der EAM zur iDCM nach Gabe eines VLA-4-Antikörpers

Im Rahmen der EAM kommt es durch kardiale Inflammation zu Fibrose von myokardialem Gewebe und im Zuge dessen zu Funktionsverlust mit eingeschränkter Kontraktilität und Ventrikeldilatation. Am Umbau des Myokards nach Schädigung maßgeblich beteiligt sind die Fibroblasten. Sie sind in der Lage die myokardiale Extrazelluläre Matrix (ECM), die aus einem flexiblen Netzwerk aus fibrillärem Kollagen, Proteoglykanen, Glykoproteinen und anderen bioaktiven Molekülen besteht, zu beeinflussen. Für die Homöostase der ECM sind wiederum als Regulatoren proteolytische Enzyme, die Matrixmetalloproteinasen (MMP) und ihre Gewebeinhibitoren (TIMP) zuständig. Kommt es zur kardialen Entzündung, werden die Fibroblasten durch Zytokine und Wachstumsfaktoren so stimuliert,

dass sie die Zusammensetzung der ECM und das Gleichgewicht zwischen MMP und TIMP verändern. In Folge kommt es zu einer Anhäufung von Kollagenen und letztendlich zur kardialen Fibrose [101]. Obwohl Fibroblasten auch im gesunden Herzen Teil des Interstitiums sind, konnte Kania et al. zeigen, dass im postinflammatorischem Stadium der EAM Fibroblastenvorstufen aus dem Knochenmark einwandern und bis zu 60% der kardialen Fibrose aus den Vorläuferzellen entsteht [102, 130]. Diese einwandernden Vorläuferzellen exprimieren Prominin-1 und können unter dem Einfluss von TGF- β zu Fibroblasten ausdifferenzieren. Sie stellen somit die größte Quelle der kardialen Fibrose bei der iDCM dar [102]. Wie erwartet bestätigt sich die Hypothese, dass der VLA-4-Antikörper die Migration der Vorläuferzellen in das kardiale Gewebe hemmt. Vier Wochen nach Antikörpergabe kann eine signifikante Reduktion von Prominin-1⁺Vorläuferzellen nachgewiesen werden (Abb.4-9d). Diese Ergebnisse stimmen mit den Daten von Gavina et al. überein, die zeigen konnten, dass Prominin-1⁺Vorläuferzellen die VCAM-1/VLA-4-Achse auch nutzen um in die Skelettmuskulatur zu gelangen [131]. Analog findet sich nach Antikörpergabe an Tag 49 eine verminderte Fibrosierung muriner Herzen (Abb.4-12). Die Reduktion von Prominin-1(CD133) könnte somit einen protektiven Mechanismus darstellen, über den der VLA-4-Antikörper in der Lage ist die Fibrosierung zu hemmen.

Darüber hinaus kommt es durch die Blockade der VCAM-1/VLA-4-Achse ebenfalls zu einer quantitativen Reduktion von CD45⁺/CD4⁺ T-Helferzellen an Tag 49 (Abb. 4-9b). Wie oben bereits beschrieben ist die EAM eine T-Zellen gesteuerte Erkrankung [5]. Afanasyeva et al. konnte zeigen, dass die Anzahl von CD4⁺ im myokardialen Infiltrat mit einem vergrößerten enddiastolischen Volumen im chronischen Stadium der EAM korreliert [66]. In vitro können naive CD4⁺ T-Helferzellen in Abhängigkeit von TGF- β und IL-6 zu Th17-Zellen differenzieren [132] [133] [68]. Daten von Baldeviano et al. demonstrieren, dass es bei der EAM während der akuten Entzündung sowohl zur Infiltration von T1-Helferzellen (Th1) als auch von Th17-Helferzellen in das kardiale Gewebe von Balb/c Mäusen kommt [72] [134]. Im Rahmen des kardialen Remodelings der EAM spielt IL17a eine essentielle Rolle bei der Fibrosierung und ist somit maßgeblich an der Progression zur iDCM beteiligt. Es ist anzunehmen, dass IL17a in der Lage ist als Signalprotein auf das Remodeling der myokardialen ECM Einfluss zu nehmen [72]. Cortez et al. konnte nachweisen, dass IL17a die Sekretion von MMP aus kardialen Fibroblasten induzieren kann [135]. Die vorliegenden Daten dieser Arbeit konnten erstmals zeigen, dass der VLA-4-Antikörper im Stande ist die Immigration von CD4⁺ T-Helferzellen im akuten Entzündungsstadium zu unterdrücken und die kardiale Fibrose zu reduzieren. Die

Unterdrückung der Progression zur iDCM lässt sich am ehesten durch die Reduktion von Th17 Lymphozyten und konsekutiv durch eine verminderte Sekretion von IL17a erklären. Zu Bestätigung dieser Hypothese sind allerdings weitere Experimente mit Differenzierung in die einzelnen T-Helfersubpopulationen notwendig. Dass es auch zu einer Reduktion von Th17 kommen muss, kann aktuell nur spekuliert werden. Kontrovers dazu beweisen die Daten von Rothhammer et al., dass die Migration von TH17 Zellen im Rahmen der EAE in das ZNS auch unabhängig vom $\alpha 4 \beta 1$ Integrin ablaufen kann. Für die Migration in das ZNS nutzen Th1 Zellen die $\alpha 4 \beta 1$ Integrine, wohingegen die Th17 Zellen vorrangig $\alpha L \beta 2$ exprimieren. $\alpha L \beta 2$ (LFA-1) ist ebenfalls ein Integrin, welches die Diapedese von T-Zellen ermöglicht und mit ICAM-1 oder ICAM-2 interagiert [136]. Ob sich diese Erkenntnisse auch auf die EAM übertragen lassen, ist aktuell nicht bekannt. Es bedarf weiterer In-vivo-Experimente, um die genaue Verteilung von Th1 und Th17 bei der Entzündungsreaktion und ihren Einfluss auf die Gewebeschädigung zu verstehen, denn sowohl Th1 als auch Th17 Zellen werden durch Immunisierung mit Peptiden und CFA verstärkt induziert [137].

Ergänzend wurde die Einschränkung der murinen Herzfunktion nach Myokarditisinduktion und konsekutiv Antikörperbehandlung mit Hilfe eines Kleintier-PET untersucht. Das FDG-Kleintier-PET ermöglicht eine serielle, nicht invasive Untersuchung. Der Einsatz des Kleintier-PET zur verlässlichen Herzfunktionsbestimmung und die Auswertung der Daten wurden bereits in diversen murinen Modellen etabliert und publiziert [138] [139] [140] [98]. In der vorliegenden Arbeit wurden jedoch erstmals Herzfunktionsmessungen mittels Kleintier-PET im Rahmen des EAM Mausmodell durchgeführt.

Im Gegensatz zu den von Massilamany et al. erhobenen Daten, der mittels Magnetresonanztomografie an Tag 21 bei EAM Mäusen ebenfalls Herzfunktionsmessungen durchgeführt hat und eine eingeschränkte EF von 49,4 ($\pm 2,3$) % beschreibt, zeigt sich die linksventrikuläre EF in dieser Arbeit an Tag 21 mit 64,5 (± 6) % im Normbereich (Abb. 4-14) [141]. Ursächlich für die Funktionseinschränkungen im akuten Stadium der Myokarditis werden die lokale Entzündung, Zellnekrose und in Folge entstehende interstitielle Ödeme gesehen [142] [19]. Obwohl histopathologisch analog dazu eine akute Inflammation muriner Herzen gezeigt werden konnte, bleibt eine signifikante Einschränkung der Herzfunktion im akuten Stadium der EAM aus (Abb. 4-2) (Abb. 4-14). Eine Ursache für die Divergenz der Ergebnisse könnten die unterschiedlichen Untersuchungsmethoden sein. Brunner et al. konnte zeigen, dass beim Vergleich von Messungen der Herzfunktionsparameter mittels Kleintier-PET zu MRT Messungen zwar eine Korrelation besteht,

jedoch sowohl die linksventrikulären Volumina als auch die linksventrikulären EF systematisch unterschätzt werden [140]. Solche Vergleichsdaten zu der Methode der Magnetresonanz-Mikroskopie liegen aktuell nicht vor. Es lassen sich jedoch ähnliche Effekte vermuten. Ergänzend wären somit weitere Untersuchungen, wie z.B. die direkte Korrelation von Histologie und Herzfunktion, notwendig um weitere Aussagen treffen zu können.

Nach der akuten myokardialen Entzündung im Rahmen der EAM kommt es wie oben beschrieben konsekutiv zu einer kardialen Fibrose. Diese konnte histopathologisch ebenfalls nachgewiesen werden (Abb.4-12). In Folge dessen ist bei der Pathogenese der iDCM wie beschrieben ein Kontraktilitätsverlust mit Ventrikeldilatation zu erwarten [6, 14]. Dementsprechend kann zwischen dem akuten Stadium an Tag 21 und dem chronischen Stadium an Tag 49 sowohl eine signifikante Zunahme des endsystolischen als auch des enddiastolischen Volumens dargestellt werden. Vor allem die Zunahme des EDV dient hierbei als Indikator für eine verstärkte Ventrikeldilatation. Einen Einfluss auf die Ventrikeldilatation durch den VLA-4-Antikörper kann in den Messungen des Kleintier-PET jedoch nicht gezeigt werden (Abb.4-15).

Als ein Parameter für die Herzfunktion dient die linksventrikuläre Ejektionsfraktion. Eine Abnahme der LVEF kann zwischen den unbehandelten Tieren an Tag 21 sowie den unbehandelten Tieren an Tag 49 nachgewiesen werden. Dies bestätigt die postulierte Progression von der akuten Entzündung im frühen Stadium zum kardialen Funktionsverlust im chronischen Stadium. Durch den Einsatz des VLA-4-Antikörpers kann ansatzweise eine leichtgradige Verbesserung der EF im chronischen Stadium gezeigt werden. Allerdings ist der Unterschied nicht signifikant (Abb. 4-14).

Zusammenfassend gehen wir davon aus, dass die Reduktion der Infiltration von Prominin-1⁺Vorläuferzellen und T-Helferzellen mittels Gabe eines VLA-4-Antikörpers während der Phase der akuten Entzündung einen Schlüsselmechanismus zur Reduktion des myokardialen Remodelings darstellt. Eine Reduktion der kardialen Fibrose durch den VLA-4-Antikörper kann hier erstmals gezeigt werden. Die erwartete Reduktion der myokardialen Dilatation durch den VLA-4-Antikörper kann nicht bestätigt werden. Möglicherweise lässt sich die LVEF durch den Einsatz des Antikörpers verbessern. Eine Erklärung für den fehlenden Einfluss auf die myokardiale Dilatation im chronischen Stadium ist die unselektive Hemmung der Migration. Dabei werden ebenfalls antiinflammatorische Subpopulationen wie die oben beschriebenen T-regulatorischen Zellen

blockiert. Dies stellt eine Erklärung für die nur eingeschränkte Verbesserung des Phänotyps dar.

5.5. Limitationen der Arbeit

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden anhand von Tierversuchen im Mausmodell durchgeführt. Die Myokarditis präsentiert sich sowohl klinisch als auch pathophysiologisch als extrem heterogen. Um ihre Therapie zu optimieren und genauere Einblicke in die zugrundeliegenden Pathomechanismen zu erlangen, sind diese Versuche unerlässlich [65]. Der Einsatz der Versuchstiere ist dabei unverzichtbar, da es derzeit nicht möglich ist ein Myokarditismodell *in vitro* nachzubilden und komplexe Interaktionen wie zum Beispiel die Progression zur iDCM zu erforschen. Das Mausmodell bietet den Vorteil einen Gesamtorganismus beurteilen zu können. Eine Übertragung der im Tierversuch präklinisch gewonnenen Daten auf den Menschen ist jedoch nicht ohne weiteres möglich. Sie sind immer als eine Annäherung an den menschlichen Organismus zu werten. Eine Verfälschung der Ergebnisse zum Beispiel durch präexistente nicht zu erfassende Unterschiede im Allgemeinzustand oder erworbene subklinische Infektionen im Laufe der Experimente sind nicht auszuschließen. Darüber hinaus lässt sich im Mausmodell der Einfluss von bestehenden Begleit- bzw. Vorerkrankungen oder genetischen Dispositionen nicht abbilden [60]. Auch geschlechterspezifische Unterschiede wurden in dem Versuchsaufbau vernachlässigt, da nur männliche Tiere behandelt und untersucht wurden. Des Weiteren kann anhand des Mausmodells und der aktuell vorliegenden Daten nicht geklärt werden, welchen Einfluss eine vorbestehende medikamentöse Myokarditistherapie auf die Ergebnisse und auf die Wirkung des VLA-4-Antikörpers hat. Zur Bestätigung der Ergebnisse sind klinische Studien im weiteren Verlauf unerlässlich.

Bei der Entwicklung der Myokarditis kann eine Vielzahl an unterschiedlichen Pathogenen eine Rolle spielen. Die Autoimmunmyokarditis mit dem EAM-Modell imitiert somit nur einen möglichen Mechanismus für die Entstehung der kardialen Inflammation. [14, 47] [61]. Obwohl das verwendete EAM Modell in der kardiologischen Forschung bereits gut etabliert ist, zeigen sich teilweise große intraindividuelle Unterschiede in der Krankungsausprägung einzelner Tiere [65]. In der vorliegenden Arbeit wiesen ca. 30% der Tiere an Tag 21 keine myokardialen Infiltrate in der HE-Färbung auf und waren somit nicht erkrankt. Eine Optimierung durch Intensivierung der Immunisierung wird in nachfolgenden Arbeiten durchgeführt werden müssen. Darüber hinaus kommt es durch die Immunisierung mit CFA zu einer unspezifischen Entzündungsreaktion, welche in vielen

Fällen neben dem murinen Herzen auch andere Organsysteme wie zum Beispiel, Leber, Milz und Muskel betrifft und die Ergebnisse beeinflusst [143].

Der Versuchsaufbau wurde analog der wissenschaftlichen Vorarbeiten zur EAM ausgewählt [5]. Die intravenöse Applikationsform und die vierwöchige Frequenz der Therapie wurde jedoch aus der Humanmedizin übernommen. Hier wird von einer ca. vierwöchigen Halbwertszeit ausgegangen. Ob sich dieses Schema pharmakologisch auf das murine Modell übertragen lässt, wurde nicht explizit überprüft. Darüber hinaus ist der VLA-Antikörper Natalizumab ein humanisierter monoklonaler Antikörper, der aus murinen Myelom Zelllinien hergestellt wird [95]. Aufgrund dessen muss auch im Mausmodell mit nicht vorhersehbaren immunologischen Reaktionen gerechnet werden, die auch für die oben beschriebenen Phänotypunterschiede ursächlich sein könnten. Eine Verifizierung der Ergebnisse mit einem für die Maus erprobten Antikörper mit geeigneter Isotypenkontrolle ist somit unerlässlich. Um darüber hinaus optimale Ergebnisse zu erzielen, sind weitere Untersuchungen zur Pharmakokinetik des VLA-4-Antikörpers im EAM Modell sinnvoll und notwendig. Bei dem großen zeitlichen Abstand der Untersuchungszeitpunkte wurden darüber hinaus ggf. wichtige inflammatorische Vorgänge übersehen, so dass weitere Untersuchungszeitpunkte in nachfolgenden Arbeiten von Nutzen sind.

Der nur leichte Trend zur Verbesserung der murinen Herzfunktion nach Antikörperintervention lässt sich zum einen durch die sehr geringe Fallzahl zum anderen durch die bereits beschriebene Streubreite der Erkrankungsausprägung und den konsekutiv fehlenden Phänotyp erklären. Um Unterschiede statistisch deutlicher zu machen, ist bei der Herzfunktionsanalyse mittels PET eine Wiederholung der Untersuchung mit höheren Tierzahlen notwendig.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Im Gegensatz zu den besser erforschten kardiovaskulären Erkrankungsursachen ist die Entstehung der Myokarditis aufgrund ihrer Heterogenität sowie ihren unterschiedlichsten Ätiologien nach wie vor nicht vollständig erforscht. Therapieoptionen stehen aktuell nur eingeschränkt zur Verfügung und beschränken sich maßgeblich auf supportive Ansätze, obwohl die kardiale Inflammation weltweit eine der Hauptursachen für die Entstehung der DCM und konsekutiv der Herzinsuffizienz darstellt. Weiterführend zählt die akute Myokarditis zu einer der häufigsten Ursachen des plötzlichen Herztodes bei jungen Erwachsenen.

Trotz unterschiedlichster Krankheitsauslöser spielt das Immunsystem und die Entwicklung einer autoimmunen Reaktion bei der Genese und dem Erkrankungsverlauf der Myokarditis eine Schlüsselrolle. Zusammenfassend lässt sich die Myokarditis als eine infektionsinduzierte Autoimmunerkrankung bezeichnen.

Im Rahmen einer akuten Myokarditis kommt es zu einer Infiltration von Entzündungszellen in das myokardiale Gewebe. Durch die immunologische Reaktion mit Inflammation kommt es zu einem strukturellen Gewebeumbau, dem kardialen Remodeling, Dies ist konsekutiv für die Entstehung einer iDCM mit kardialen Funktionsverlust verantwortlich. Die VCAM-1/VLA-4-Achse nimmt dabei einen entscheidenden Einfluss auf die Migration von Entzündungszellen in das kardiale Gewebe.

Ziel dieser Arbeit war es anhand eines Mausmodells für die experimentelle Autoimmunmyokarditis (EAM) die VCAM-1/VLA-4-Achse und ihre Bedeutung für die Entstehung der kardialen Inflammation sowie des kardialen Funktionsverlustes zu untersuchen. Darüber hinaus sollte der Einsatz eines monoklonalen VLA-4-Antikörpers als möglicher therapeutischer Ansatz der EAM evaluiert werden.

Analog der Hypothese zeigte sich sowohl eine Hochregulation von kardialem VCAM-1 als auch von sVCAM-1 im murinen Plasma. Eine Aktivierung der VCAM-1/VLA-4-Achse im Rahmen der EAM kann somit bestätigt werden. Konsekutiv kommt es nach Inhibition der VCAM-1/VLA-4-Achse mittels VLA-4-Antikörper sowohl zu einer Reduktion der histologischen Entzündungsinfiltrate als auch zu einer quantitativen Reduktion der Leukozytensubpopulationen im akuten Stadium. Im chronischen Stadium zeigt sich nach Antikörpergabe eine verminderte Ausbildung der kardialen Fibrose. Ferner scheint die VLA-4-Antikörpertherapie im chronischen Stadium auch einen geringfügigen

positiven Effekt auf die kardiale Funktion zu haben, indem es zu einer verminderten Einschränkung der kardialen Pumpfunktion kommt.

Die Blockade der VCAM-1/VLA-4-Achse mit Hilfe eines VLA-4-Antikörpers könnte somit einen vielversprechenden neuen Ansatz der Myokarditistherapie darstellen und die im Tiermodell erhobenen Daten eine Grundlage für zukünftige klinische Phase-II-Studien bilden.

7. LITERATURVERZEICHNIS

1. Richardson, P., et al., *Report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the Definition and Classification of cardiomyopathies*. *Circulation*, 1996. **93**(5): p. 841-2.
2. Blyszczuk, P., et al., *Nitric oxide synthase 2 is required for conversion of pro-fibrogenic inflammatory CD133+ progenitors into F4/80+ macrophages in experimental autoimmune myocarditis*. *Cardiovasc Res*, 2012.
3. Fung, G., et al., *Myocarditis*. *Circ Res*, 2016. **118**(3): p. 496-514.
4. Caforio, A.L., et al., *Current state of knowledge on aetiology, diagnosis, management, and therapy of myocarditis: a position statement of the European Society of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases*. *Eur Heart J*, 2013. **34**(33): p. 2636-48, 2648a-2648d.
5. Afanasyeva, M., D. Georgakopoulos, and N.R. Rose, *Autoimmune myocarditis: cellular mediators of cardiac dysfunction*. *Autoimmun Rev*, 2004. **3**(7-8): p. 476-86.
6. Weintraub, R.G., C. Semsarian, and P. Macdonald, *Dilated cardiomyopathy*. *Lancet*, 2017.
7. Maron, B.J., *The 2006 American Heart Association classification of cardiomyopathies is the gold standard*. *Circ Heart Fail*, 2008. **1**(1): p. 72-5; discussion 76.
8. Maron, B.J., et al., *Contemporary definitions and classification of the cardiomyopathies: an American Heart Association Scientific Statement from the Council on Clinical Cardiology, Heart Failure and Transplantation Committee; Quality of Care and Outcomes Research and Functional Genomics and Translational Biology Interdisciplinary Working Groups; and Council on Epidemiology and Prevention*. *Circulation*, 2006. **113**(14): p. 1807-16.

9. Lee, J.H., et al., *Myosin-primed tolerogenic dendritic cells ameliorate experimental autoimmune myocarditis*. Cardiovasc Res, 2014. **101**(2): p. 203-10.
10. Kindermann, I., et al., *Update on myocarditis*. J Am Coll Cardiol, 2012. **59**(9): p. 779-92.
11. Caforio, A.L., et al., *Immune-mediated and autoimmune myocarditis: clinical presentation, diagnosis and management*. Heart Fail Rev, 2012.
12. Schultheiss, H.P., U. Kuhl, and L.T. Cooper, *The management of myocarditis*. Eur Heart J, 2011. **32**(21): p. 2616-25.
13. Bonney, K.M. and D.M. Engman, *Autoimmune pathogenesis of Chagas heart disease: looking back, looking ahead*. Am J Pathol, 2015. **185**(6): p. 1537-47.
14. Sagar, S., P.P. Liu, and L.T. Cooper, Jr., *Myocarditis*. Lancet, 2012. **379**(9817): p. 738-47.
15. Suzuki, J., et al., *Autoimmune giant cell myocarditis: clinical characteristics, experimental models and future treatments*. Expert Opin Ther Targets, 2011. **15**(10): p. 1163-72.
16. Ukena, C., et al., *Prognostic electrocardiographic parameters in patients with suspected myocarditis*. Eur J Heart Fail, 2011. **13**(4): p. 398-405.
17. Magnani, J.W. and G.W. Dec, *Myocarditis: current trends in diagnosis and treatment*. Circulation, 2006. **113**(6): p. 876-90.
18. Pauschinger, M., et al., *Inflammation, ECG changes and pericardial effusion: whom to biopsy in suspected myocarditis?* Clin Res Cardiol, 2006. **95**(11): p. 569-83.
19. Felker, G.M., et al., *Echocardiographic findings in fulminant and acute myocarditis*. J Am Coll Cardiol, 2000. **36**(1): p. 227-32.

20. Childs, H. and M.G. Friedrich, *Cardiovascular magnetic resonance imaging in myocarditis*. Prog Cardiovasc Dis, 2011. **54**(3): p. 266-75.
21. Mahrholdt, H., et al., *Cardiovascular magnetic resonance assessment of human myocarditis: a comparison to histology and molecular pathology*. Circulation, 2004. **109**(10): p. 1250-8.
22. Baessler, B., et al., *Modern Imaging of Myocarditis: Possibilities and Challenges*. Rofo, 2016. **188**(10): p. 915-25.
23. Assomull, R.G., et al., *The role of cardiovascular magnetic resonance in patients presenting with chest pain, raised troponin, and unobstructed coronary arteries*. Eur Heart J, 2007. **28**(10): p. 1242-9.
24. Caforio, A.L., et al., *A prospective study of biopsy-proven myocarditis: prognostic relevance of clinical and aetiopathogenetic features at diagnosis*. Eur Heart J, 2007. **28**(11): p. 1326-33.
25. Kindermann, I., et al., *Predictors of outcome in patients with suspected myocarditis*. Circulation, 2008. **118**(6): p. 639-48.
26. Cooper, L.T., et al., *The role of endomyocardial biopsy in the management of cardiovascular disease: a scientific statement from the American Heart Association, the American College of Cardiology, and the European Society of Cardiology*. Circulation, 2007. **116**(19): p. 2216-33.
27. Baughman, K.L., *Diagnosis of myocarditis: death of Dallas criteria*. Circulation, 2006. **113**(4): p. 593-5.
28. Yilmaz, A., et al., *Comparative evaluation of left and right ventricular endomyocardial biopsy: differences in complication rate and diagnostic performance*. Circulation, 2010. **122**(9): p. 900-9.

29. Holzmann, M., et al., *Complication rate of right ventricular endomyocardial biopsy via the femoral approach: a retrospective and prospective study analyzing 3048 diagnostic procedures over an 11-year period*. *Circulation*, 2008. **118**(17): p. 1722-8.
30. McMurray, J.J., et al., *ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC*. *Eur Heart J*, 2012. **33**(14): p. 1787-847.
31. Pages, O.N., et al., *Paracorporeal pulsatile biventricular assist device versus extracorporeal membrane oxygenation-extracorporeal life support in adult fulminant myocarditis*. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2009. **137**(1): p. 194-7.
32. Cooper, L.T., Jr., *Myocarditis*. *N Engl J Med*, 2009. **360**(15): p. 1526-38.
33. Kuhl, U., et al., *Interferon-beta treatment eliminates cardiotropic viruses and improves left ventricular function in patients with myocardial persistence of viral genomes and left ventricular dysfunction*. *Circulation*, 2003. **107**(22): p. 2793-8.
34. Schultheiss, H.P., et al., *Betaferon in chronic viral cardiomyopathy (BICC) trial: Effects of interferon-beta treatment in patients with chronic viral cardiomyopathy*. *Clin Res Cardiol*, 2016. **105**(9): p. 763-73.
35. Stanton, C., et al., *Greater symptom duration predicts response to immunomodulatory therapy in dilated cardiomyopathy*. *Int J Cardiol*, 2008. **128**(1): p. 38-41.
36. Frustaci, A., M. Pieroni, and C. Chimenti, *Immunosuppressive treatment of chronic non-viral myocarditis*. *Ernst Schering Res Found Workshop*, 2006(55): p. 343-51.

37. Wojnicz, R., et al., *Randomized, placebo-controlled study for immunosuppressive treatment of inflammatory dilated cardiomyopathy: two-year follow-up results*. *Circulation*, 2001. **104**(1): p. 39-45.
38. Frustaci, A., M.A. Russo, and C. Chimenti, *Randomized study on the efficacy of immunosuppressive therapy in patients with virus-negative inflammatory cardiomyopathy: the TIMIC study*. *Eur Heart J*, 2009. **30**(16): p. 1995-2002.
39. Escher, F., et al., *Long-term outcome of patients with virus-negative chronic myocarditis or inflammatory cardiomyopathy after immunosuppressive therapy*. *Clin Res Cardiol*, 2016. **105**(12): p. 1011-1020.
40. Mason, J.W., et al., *A Clinical-Trial of Immunosuppressive Therapy for Myocarditis*. *New England Journal of Medicine*, 1995. **333**(5): p. 269-275.
41. Felix, S.B., A. Staudt, and G.B. Friedrich, *Improvement of cardiac function after immunoabsorption in patients with dilated cardiomyopathy*. *Autoimmunity*, 2001. **34**(3): p. 211-5.
42. Felix, S.B., D. Beug, and M. Dorr, *Immunoabsorption therapy in dilated cardiomyopathy*. *Expert Rev Cardiovasc Ther*, 2015. **13**(2): p. 145-52.
43. Kandolin, R., et al., *Diagnosis, treatment, and outcome of giant-cell myocarditis in the era of combined immunosuppression*. *Circ Heart Fail*, 2013. **6**(1): p. 15-22.
44. Cooper, L.T., Jr., 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*, 1997. **336**(26): p. 1860-6.
45. Kuchynka, P., et al., *Current Diagnostic and Therapeutic Aspects of Eosinophilic Myocarditis*. *Biomed Res Int*, 2016. **2016**: p. 2829583.

46. Ogbogu, P.U., et al., *Hypereosinophilic syndrome: a multicenter, retrospective analysis of clinical characteristics and response to therapy*. J Allergy Clin Immunol, 2009. **124**(6): p. 1319-25 e3.
47. Blauwet, L.A. and L.T. Cooper, *Myocarditis*. Prog Cardiovasc Dis, 2010. **52**(4): p. 274-88.
48. Anzini, M., et al., *Long-term evolution and prognostic stratification of biopsy-proven active myocarditis*. Circulation, 2013. **128**(22): p. 2384-94.
49. Neu, N., et al., *Cardiac myosin induces myocarditis in genetically predisposed mice*. J Immunol, 1987. **139**(11): p. 3630-6.
50. Assomull, R.G., et al., *Cardiovascular magnetic resonance, fibrosis, and prognosis in dilated cardiomyopathy*. J Am Coll Cardiol, 2006. **48**(10): p. 1977-85.
51. Elamm, C., D. Fairweather, and L.T. Cooper, *Pathogenesis and diagnosis of myocarditis*. Heart, 2012. **98**(11): p. 835-40.
52. Feldman, A.M. and D. McNamara, *Myocarditis*. N Engl J Med, 2000. **343**(19): p. 1388-98.
53. Rose, N.R., *Learning from myocarditis: mimicry, chaos and black holes*. F1000Prime Rep, 2014. **6**: p. 25.
54. Kuhl, U., et al., *Viral persistence in the myocardium is associated with progressive cardiac dysfunction*. Circulation, 2005. **112**(13): p. 1965-70.
55. Caforio, A.L., et al., *Clinical implications of anti-heart autoantibodies in myocarditis and dilated cardiomyopathy*. Autoimmunity, 2008. **41**(1): p. 35-45.
56. Neumann, D.A., et al., *Circulating heart-reactive antibodies in patients with myocarditis or cardiomyopathy*. J Am Coll Cardiol, 1990. **16**(6): p. 839-46.

57. Caforio, A.L., et al., *Identification of alpha- and beta-cardiac myosin heavy chain isoforms as major autoantigens in dilated cardiomyopathy*. *Circulation*, 1992. **85**(5): p. 1734-42.
58. Lauer, B., et al., *Antimyosin autoantibodies are associated with deterioration of systolic and diastolic left ventricular function in patients with chronic myocarditis*. *J Am Coll Cardiol*, 2000. **35**(1): p. 11-8.
59. Warraich, R.S., et al., *Immunoglobulin G3 cardiac myosin autoantibodies correlate with left ventricular dysfunction in patients with dilated cardiomyopathy: immunoglobulin G3 and clinical correlates*. *Am Heart J*, 2002. **143**(6): p. 1076-84.
60. Li, H.S., D.L. Ligon, and N.R. Rose, *Genetic complexity of autoimmune myocarditis*. *Autoimmun Rev*, 2008. **7**(3): p. 168-73.
61. Rose, N.R. and S.L. Hill, *Autoimmune myocarditis*. *Int J Cardiol*, 1996. **54**(2): p. 171-5.
62. Wolfgram, L.J., et al., *Variations in the susceptibility to Coxsackievirus B3-induced myocarditis among different strains of mice*. *J Immunol*, 1986. **136**(5): p. 1846-52.
63. Ligon, D.L., et al., *A locus on chromosome 1 promotes susceptibility of experimental autoimmune myocarditis and lymphocyte cell death*. *Clin Immunol*, 2009. **130**(1): p. 74-82.
64. Kuan, A.P., et al., *Genetic control of autoimmune myocarditis mediated by myosin-specific antibodies*. *Immunogenetics*, 1999. **49**(2): p. 79-85.
65. Cihakova, D. and N.R. Rose, *Pathogenesis of myocarditis and dilated cardiomyopathy*. *Adv Immunol*, 2008. **99**: p. 95-114.

66. Afanasyeva, M., et al., *Quantitative analysis of myocardial inflammation by flow cytometry in murine autoimmune myocarditis: correlation with cardiac function*. Am J Pathol, 2004. **164**(3): p. 807-15.
67. Afanasyeva, M., et al., *Experimental autoimmune myocarditis in A/J mice is an interleukin-4-dependent disease with a Th2 phenotype*. Am J Pathol, 2001. **159**(1): p. 193-203.
68. Korn, T., et al., *IL-17 and Th17 Cells*. Annu Rev Immunol, 2009. **27**: p. 485-517.
69. Martinez, N.E., et al., *Regulatory T cells and Th17 cells in viral infections: implications for multiple sclerosis and myocarditis*. Future Virol, 2012. **7**(6): p. 593-608.
70. Xie, Y., et al., *The role of Th17 cells and regulatory T cells in Coxsackievirus B3-induced myocarditis*. Virology, 2011. **421**(1): p. 78-84.
71. Rose, N.R., *Critical cytokine pathways to cardiac inflammation*. J Interferon Cytokine Res, 2011. **31**(10): p. 705-10.
72. Baldeviano, G.C., et al., *Interleukin-17A Is Dispensable for Myocarditis but Essential for the Progression to Dilated Cardiomyopathy*. Circ Res, 2010. **106**(10): p. 1646-1655.
73. Wu, L., et al., *Cardiac fibroblasts mediate IL-17A-driven inflammatory dilated cardiomyopathy*. J Exp Med, 2014. **211**(7): p. 1449-64.
74. Kania, G., et al., *Prominin-1+/CD133+ bone marrow-derived heart-resident cells suppress experimental autoimmune myocarditis*. Cardiovasc Res, 2008. **80**(2): p. 236-45.
75. Cook-Mills, J.M., M.E. Marchese, and H. Abdala-Valencia, *Vascular cell adhesion molecule-1 expression and signaling during disease: regulation by reactive oxygen species and antioxidants*. Antioxid Redox Signal, 2011. **15**(6): p. 1607-38.

76. Yusuf-Makagiansar, H., et al., *Inhibition of LFA-1/ICAM-1 and VLA-4/VCAM-1 as a therapeutic approach to inflammation and autoimmune diseases*. Med Res Rev, 2002. **22**(2): p. 146-67.
77. Cybulsky, M.I., et al., *Gene structure, chromosomal location, and basis for alternative mRNA splicing of the human VCAM1 gene*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(17): p. 7859-63.
78. Cybulsky, M.I., M. Allan-Motamed, and T. Collins, *Structure of the murine VCAM1 gene*. Genomics, 1993. **18**(2): p. 387-91.
79. Fehon, R.G., A.I. McClatchey, and A. Bretscher, *Organizing the cell cortex: the role of ERM proteins*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2010. **11**(4): p. 276-87.
80. van Wetering, S., et al., *VCAM-1-mediated Rac signaling controls endothelial cell-cell contacts and leukocyte transmigration*. Am J Physiol Cell Physiol, 2003. **285**(2): p. C343-52.
81. Lewis, M.J., et al., *Improved monitoring of clinical response in Systemic Lupus Erythematosus by longitudinal trend in soluble vascular cell adhesion molecule-1*. Arthritis Res Ther, 2016. **18**: p. 5.
82. Garton, K.J., et al., *Stimulated shedding of vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) is mediated by tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (ADAM 17)*. J Biol Chem, 2003. **278**(39): p. 37459-64.
83. Cheng, C.H., et al., *Higher serum levels of soluble intracellular cell adhesion molecule-1 and soluble vascular cell adhesion molecule predict peripheral artery disease in haemodialysis patients*. Nephrology (Carlton), 2012. **17**(8): p. 718-24.
84. Jha, H.C., et al., *Plasma circulatory markers in male and female patients with coronary artery disease*. Heart Lung, 2010. **39**(4): p. 296-303.

85. Dymicka-Piekarska, V., et al., *Prognostic significance of adhesion molecules (sICAM-1, sVCAM-1) and VEGF in colorectal cancer patients*. *Thromb Res*, 2012. **129**(4): p. e47-50.
86. Shilikina, N.P., et al., *[Markers of endothelial activation in rheumatoid arthritis]*. *Ter Arkh*, 2012. **84**(8): p. 29-32.
87. Peter, K., et al., *Soluble vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) as potential marker of atherosclerosis*. *Thromb Haemost*, 1999. **82 Suppl 1**: p. 38-43.
88. Ueki, S., et al., *Soluble vascular cell adhesion molecule-1 induces human eosinophil migration*. *Allergy*, 2009. **64**(5): p. 718-24.
89. Tokuhira, M., et al., *Soluble vascular cell adhesion molecule 1 mediation of monocyte chemotaxis in rheumatoid arthritis*. *Arthritis Rheum*, 2000. **43**(5): p. 1122-33.
90. Leuschner, F., H.A. Katus, and Z. Kaya, *Autoimmune myocarditis: past, present and future*. *J Autoimmun*, 2009. **33**(3-4): p. 282-9.
91. Selewski, D.T., et al., *Natalizumab (Tysabri)*. *AJNR Am J Neuroradiol*, 2010. **31**(9): p. 1588-90.
92. Bloomgren, G., et al., *Risk of natalizumab-associated progressive multifocal leukoencephalopathy*. *N Engl J Med*, 2012. **366**(20): p. 1870-80.
93. Polman, C.H., et al., *A randomized, placebo-controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis*. *N Engl J Med*, 2006. **354**(9): p. 899-910.
94. Thomas, S. and D.C. Baumgart, *Targeting leukocyte migration and adhesion in Crohn's disease and ulcerative colitis*. *Inflammopharmacology*, 2012. **20**(1): p. 1-18.
95. Iaffaldano, P., G. Lucchese, and M. Trojano, *Treating multiple sclerosis with natalizumab*. *Expert Rev Neurother*, 2011. **11**(12): p. 1683-92.

96. Rispens, T., et al., *Natalizumab remains detectable in patients with multiple sclerosis long after treatment is stopped*. *Mult Scler*, 2012. **18**(6): p. 899-901.
97. Blyszczuk, P., et al., *GM-CSF promotes inflammatory dendritic cell formation but does not contribute to disease progression in experimental autoimmune myocarditis*. *Biochim Biophys Acta*, 2012.
98. Stegger, L., et al., *Quantification of left ventricular volumes and ejection fraction in mice using PET, compared with MRI*. *J Nucl Med*, 2009. **50**(1): p. 132-8.
99. Rother, M., et al., *Matricellular signaling molecule CCN1 attenuates experimental autoimmune myocarditis by acting as a novel immune cell migration modulator*. *Circulation*, 2010. **122**(25): p. 2688-98.
100. Sakaguchi, S., et al., *Regulatory T cells and immune tolerance*. *Cell*, 2008. **133**(5): p. 775-87.
101. Kania, G., P. Blyszczuk, and U. Eriksson, *Mechanisms of cardiac fibrosis in inflammatory heart disease*. *Trends Cardiovasc Med*, 2009. **19**(8): p. 247-52.
102. Kania, G., et al., *Heart-infiltrating prominin-1+/CD133+ progenitor cells represent the cellular source of transforming growth factor beta-mediated cardiac fibrosis in experimental autoimmune myocarditis*. *Circ Res*, 2009. **105**(5): p. 462-70.
103. Eriksson, U., et al., *Interleukin-6-deficient mice resist development of autoimmune myocarditis associated with impaired upregulation of complement C3*. *Circulation*, 2003. **107**(2): p. 320-5.
104. Mason, J.C., P. Kapahi, and D.O. Haskard, *Detection of increased levels of circulating intercellular adhesion molecule 1 in some patients with rheumatoid arthritis but not in patients with systemic lupus erythematosus. Lack of correlation with levels of circulating vascular cell adhesion molecule 1*. *Arthritis Rheum*, 1993. **36**(4): p. 519-27.

105. Teng, Y.K., et al., *Long-term followup of health status in patients with severe rheumatoid arthritis after high-dose chemotherapy followed by autologous hematopoietic stem cell transplantation*. *Arthritis Rheum*, 2005. **52**(8): p. 2272-6.
106. Katz, A.M. and E.L. Rolett, *Heart failure: when form fails to follow function*. *Eur Heart J*, 2016. **37**(5): p. 449-54.
107. Miller, G.A., J.W. Kirklin, and H.J. Swan, *Myocardial Function and Left Ventricular Volumes in Acquired Valvular Insufficiency*. *Circulation*, 1965. **31**: p. 374-84.
108. Brunner, S., et al., *Enhanced stem cell migration mediated by VCAM-1/VLA-4 interaction improves cardiac function in virus-induced dilated cardiomyopathy*. *Basic Res Cardiol*, 2013. **108**(6): p. 388.
109. Theiss, H.D., et al., *Circulation of CD34+ progenitor cell populations in patients with idiopathic dilated and ischaemic cardiomyopathy (DCM and ICM)*. *Eur Heart J*, 2007. **28**(10): p. 1258-64.
110. Spronk, P.E., et al., *Levels of soluble VCAM-1, soluble ICAM-1, and soluble E-selectin during disease exacerbations in patients with systemic lupus erythematosus (SLE); a long term prospective study*. *Clin Exp Immunol*, 1994. **97**(3): p. 439-44.
111. Cooper, L.T., Jr., *Giant cell myocarditis: diagnosis and treatment*. *Herz*, 2000. **25**(3): p. 291-8.
112. Cruz-Adalia, A., et al., *CD69 limits the severity of cardiomyopathy after autoimmune myocarditis*. *Circulation*, 2010. **122**(14): p. 1396-404.
113. Grabmaier, U., et al., *Soluble Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1) as a Biomarker in the Mouse Model of Experimental Autoimmune Myocarditis (EAM)*. *PLoS One*, 2016. **11**(8): p. e0158299.

114. Watanabe, K., et al., *Regulation of inflammation and myocardial fibrosis in experimental autoimmune myocarditis*. *Inflamm Allergy Drug Targets*, 2011. **10**(3): p. 218-25.
115. Grewal, I.S., et al., *CD62L is required on effector cells for local interactions in the CNS to cause myelin damage in experimental allergic encephalomyelitis*. *Immunity*, 2001. **14**(3): p. 291-302.
116. Damle, N.K. and A. Aruffo, *Vascular cell adhesion molecule 1 induces T-cell antigen receptor-dependent activation of CD4+T lymphocytes*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991. **88**(15): p. 6403-7.
117. Kent, S.J., et al., *A monoclonal antibody to alpha 4 integrin suppresses and reverses active experimental allergic encephalomyelitis*. *J Neuroimmunol*, 1995. **58**(1): p. 1-10.
118. Yednock, T.A., et al., *Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by antibodies against alpha 4 beta 1 integrin*. *Nature*, 1992. **356**(6364): p. 63-6.
119. Baron, J.L., et al., *Surface expression of alpha 4 integrin by CD4 T cells is required for their entry into brain parenchyma*. *J Exp Med*, 1993. **177**(1): p. 57-68.
120. Stuve, O., et al., *Immune surveillance in multiple sclerosis patients treated with natalizumab*. *Ann Neurol*, 2006. **59**(5): p. 743-7.
121. Sievers, C., et al., *Altered microRNA expression in B lymphocytes in multiple sclerosis: towards a better understanding of treatment effects*. *Clin Immunol*, 2012. **144**(1): p. 70-9.
122. Mellergard, J., et al., *Natalizumab treatment in multiple sclerosis: marked decline of chemokines and cytokines in cerebrospinal fluid*. *Mult Scler*, 2010. **16**(2): p. 208-17.

123. Ramos-Cejudo, J., et al., *Treatment with natalizumab in relapsing-remitting multiple sclerosis patients induces changes in inflammatory mechanism*. J Clin Immunol, 2011. **31**(4): p. 623-31.
124. Miller, D.H., et al., *A controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis*. N Engl J Med, 2003. **348**(1): p. 15-23.
125. Wei, L., et al., *Upregulation of CD4+CD25+ T lymphocyte by adenovirus-mediated gene transfer of CTLA4Ig fusion protein in experimental autoimmune myocarditis*. Autoimmunity, 2006. **39**(4): p. 289-98.
126. Noutsias, M., et al., *Expression of functional T-cell markers and T-cell receptor Vbeta repertoire in endomyocardial biopsies from patients presenting with acute myocarditis and dilated cardiomyopathy*. Eur J Heart Fail, 2011. **13**(6): p. 611-8.
127. Huber, S.A., A.M. Feldman, and D. Sartini, *Coxsackievirus B3 induces T regulatory cells, which inhibit cardiomyopathy in tumor necrosis factor-alpha transgenic mice*. Circ Res, 2006. **99**(10): p. 1109-16.
128. Shi, Q., et al., *[Regulatory T cells in the treatment of autoimmune myositis in mice: efficacy and mechanism]*. Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao, 2015. **35**(4): p. 602-5.
129. Meng, X., et al., *Regulatory T cells in cardiovascular diseases*. Nat Rev Cardiol, 2016. **13**(3): p. 167-79.
130. Blyszczuk, P., et al., *Myeloid differentiation factor-88/interleukin-1 signaling controls cardiac fibrosis and heart failure progression in inflammatory dilated cardiomyopathy*. Circ Res, 2009. **105**(9): p. 912-20.
131. Gavina, M., et al., *VCAM-1 expression on dystrophic muscle vessels has a critical role in the recruitment of human blood-derived CD133+ stem cells after intra-arterial transplantation*. Blood, 2006. **108**(8): p. 2857-66.

132. Reiner, S.L., *Development in motion: helper T cells at work*. Cell, 2007. **129**(1): p. 33-6.
133. Bettelli, E., et al., *Induction and effector functions of T(H)17 cells*. Nature, 2008. **453**(7198): p. 1051-7.
134. Chen, P., et al., *Susceptibility to autoimmune myocarditis is associated with intrinsic differences in CD4(+) T cells*. Clin Exp Immunol, 2012. **169**(2): p. 79-88.
135. Cortez, D.M., et al., *IL-17 stimulates MMP-1 expression in primary human cardiac fibroblasts via p38 MAPK- and ERK1/2-dependent C/EBP-beta , NF-kappaB, and AP-1 activation*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007. **293**(6): p. H3356-65.
136. Rothhammer, V., et al., *Th17 lymphocytes traffic to the central nervous system independently of alpha4 integrin expression during EAE*. J Exp Med, 2011. **208**(12): p. 2465-76.
137. Hirota, K., et al., *Fate mapping of IL-17-producing T cells in inflammatory responses*. Nat Immunol, 2011. **12**(3): p. 255-63.
138. Croteau, E., et al., *Quantitative gated PET for the assessment of left ventricular function in small animals*. J Nucl Med, 2003. **44**(10): p. 1655-61.
139. Todica, A., et al., *In-vivo monitoring of erythropoietin treatment after myocardial infarction in mice with [(6)(8)Ga]Annexin A5 and [(1)(8)F]FDG PET*. J Nucl Cardiol, 2014. **21**(6): p. 1191-9.
140. Brunner, S., et al., *Left ventricular functional assessment in murine models of ischemic and dilated cardiomyopathy using [18 F]FDG-PET: comparison with cardiac MRI and monitoring erythropoietin therapy*. EJNMMI Res, 2012. **2**(1): p. 43.
141. Massilamany, C., et al., *Noninvasive assessment of cardiac abnormalities in experimental autoimmune myocarditis by magnetic resonance microscopy imaging in the mouse*. J Vis Exp, 2014(88): p. e51654.

-
142. Hiramitsu, S., et al., *Significance of transient left ventricular wall thickening in acute lymphocytic myocarditis*. Heart Vessels, 2007. **22**(1): p. 25-9.
143. Fontes, J.A., et al., *Complete Freund's adjuvant induces experimental autoimmune myocarditis by enhancing IL-6 production during initiation of the immune response*. Immun Inflamm Dis, 2017. **5**(2): p. 163-176.

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1-1:	<i>Pathogenese der Myokarditis modifiziert nach [47]</i>	7
Abb. 1-2:	<i>Die Phasen der Experimentellen Autoimmunmyokarditis (EAM) im Mausmodell modifiziert nach [65].</i>	11
Abb. 1-3:	<i>Transendotheliale Leukozyten Migration [75]</i>	13
Abb. 1-4:	<i>Liganden Bindung zu VCAM-1 modifiziert nach [75]</i>	15
Abb. 3-1:	<i>Übersicht des Versuchsaufbaus modifiziert nach Leuschner et al. [90].</i>	22
Abb. 3-2:	<i>Versuchsdesign der verschiedenen Interventionszeitpunkte</i>	23
Abb. 3-3:	<i>Versuchsdesign der Antikörperintervention an Tag 21 und 49</i>	24
Abb. 3-4:	<i>Darstellung eines unbehandelten murinen Herz im Kleintierpet am Tag 21.</i>	33
Abb. 3-5:	<i>Zeitlicher Ablauf der Micro-PET-Messung</i>	34
Abb. 4-1:	<i>Histologischer Schnitt des linken Ventrikels eines murinen Herzens 21 Tage nach Immunisierung</i>	36
Abb. 4-2:	<i>Zeitreihe der akuten Entzündung in der HE-Färbung.</i>	37
Abb. 4-3:	<i>Zeitreihe der prozentualen Verteilung intrakardialer Entzündungszellen. Bestimmung mittels Durchflusszytometrie.</i>	39
Abb. 4-4:	<i>Zeitreihe der kardialen VCAM-1 Spiegel im murinen Herzen</i>	40
Abb. 4-5:	<i>Zeitreihe der sVCAM-1 Spiegel im murinen Plasma</i>	41
Abb. 4-6:	<i>Korrelation der murinen sVCAM-1-Plasmalevel mit dem EAM-Score an Tag 21</i>	41
Abb. 4-7:	<i>Vergleich der myokardialen Entzündung von behandelten mit unbehandelten Tieren.</i>	42
Abb. 4-8:	<i>Der Einfluss des VLA-4-Antikörpers auf die murinen sVCAM-1-Plasmalevel</i>	43
Abb. 4-9:	<i>Die prozentuale Verteilung der intrakardialen Entzündungszellen mit und ohne Antikörpertherapie an Tag 49.</i>	44
Abb. 4-10:	<i>FACS-Scattergramme von Myokard infiltrierenden CD45+/VLA-4+ Zellen</i>	45
Abb. 4-11:	<i>FACS-Scattergramm von Myokard infiltrierenden CD45+/CD4+ T-Helferzellen</i>	46
Abb. 4-12:	<i>Einfluss des VLA-4-Antikörpers auf den Fibroseanteil des murinen Herzens an Tag 49</i>	47

Abb. 4-13:	<i>Histologischer Schnitt von dem linken Ventrikel einer im chronischen Stadium erkrankten Maus an Tag 49.</i>	47
Abb. 4-14:	<i>Darstellung der EF an Tag 49 von behandelten und unbehandelten Tieren.</i>	49
Abb. 4-15:	<i>Darstellung von EDV und ESV an Tag 21 und an Tag 49 mit und ohne Antikörperintervention.</i>	49
Abb. 4-16:	<i>Korrelation von sVCAM-1-Level an Tag 49 mit a) dem EDV und b) der LVEF.</i>	50

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1-1: Myokarditisätiologie, modifiziert nach [12].....	3
Tabelle 3-1: Grading der EAM analog zu [97].....	27
Tabelle 3-2: Antikörperübersicht.....	30
Tabelle 3-3: Antikörper, alle Angaben in μl	31
Tabelle 3-4: Murine Normwerte der Herzfunktionsparameter modifiziert nach Stegger et al. [98].	35

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ADAM	Disintegrin-und Metalloprotease
BSA	bovines Serumalbumin
CAM	Zelladhäsionsmolekül
CD	Cluster of differentaition
CFA	Complete Freund Adjuvant
cMRI	kardiale Magnetresonanztomographie
CVB3	Coxackievirus B3
DCM	Dilatative Kardiomyopathie
EAM	Experimentelle Autoimmunmyokarditis
ECMO	extrakorporale Membranoxygenierung
ECM	extrazelluläre Matrix
EDV	Enddiastolisches Volumen
EF	Ejektionsfraktion
EKG	Elektrokardiogramm
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
ESV	Endsystolisches Volumen
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FDG	F-18-flourdesoxyglucose
FELASA	Federation of European Laboratory Animal Sience Associations
FITC	Fluorescein-Isothiocynat
FSC	Forward Scetter
HE	Hämalaun-Eosin
HG	Herzgewicht
iDCM	inflammatorische dilatative Kardiomyopathie
IgSF	Immunglobulin-Superfamilie
IL1 β	Interleukin-1 β
Il 17a	Interleukin-17a
KG	Körpergewicht
LVEF	linksventrikuläre Ejektionsfraktion
MMP	Matrixmetalloprotease
NaCl	Natrium Chlorid
NYHA	New-York-Heart-Assosication
PBS	Phosphate buffered saline
PE	Phycoerythin

PerCP	Peridinin Chlorophyll-A-Protein
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
SSC	Sideward Scatter
SV	Schlagvolumen
Th1	T1-Helferzelle
TIMP	Tissue Inhibitor of Matrixmetalloproteinase
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF α	Tumornekrosefaktor α
VCAM	Vaskuläres Zelladhäsionsmolekül
VLA-4	Very-Late-Antigen

