Aus der

Medizinischen Klinik und Poliklinik I der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Professor Dr. med. Steffen Massberg

Mechanismen und Therapie entzündlicher Herzerkrankungen und der Herzinsuffizienz



Kumulative Habilitationsschrift

Zum Erlangen der Lehrbefugnis (venia legendi)

für das Fach Innere Medizin

vorgelegt von

Dr. med. Ludwig Thomas Weckbach

(2021)

Inhaltsverzeichnis

| 1. | Verzeichnis der in der Habilitationsschrift zusammengefassten Publikationen |
|-----|--|
| 2. | Einleitung |
| 3. | Ergebnisse und Diskussion |
| 3.1 | Die Rolle von NETs für die myokardiale Inflammation im Rahmen der Myokarditis6 |
| 3.2 | Die Bedeutung von Adhäsionsmolekülen für die inflammatorische Antwort bei der |
| | Myokarditis14 |
| 3.3 | Die myokardiale Inflammation sowie Funktion im Rahmen von COVID-1917 |
| 4. | Ausblick |
| 5. | Zusammenfassung |
| 6. | Literaturverzeichnis |
| 7. | Abkürzungsverzeichnis |
| 8. | Danksagung |
| 9. | Publikationsverzeichnis |

1. Verzeichnis der in der Habilitationsschrift zusammengefassten Publikationen

Bieber S, Kraechan A, Hellmuth JC, Muenchhoff M, Scherer C, Schroeder I, Irlbeck M, Kaeaeb S, Massberg S, Hausleiter J, Grabmaier U, Orban M, **Weckbach LT**. Left and right ventricular dysfunction in patients with COVID-19 associated myocardial injury. *Infection* 2021.

Weckbach LT, Curta A, Bieber S, Kraechan A, Brado J, Hellmuth J, Muenchhoff M, Scherer C, SchroederI, Irlbeck M, Maurus M, Ricke J, Klingel K, Kääb S, Orban M, Massberg S, Hausleiter J, Grabmaier U. Myocardial inflammation and dysfunction in COVID-19 associated myocardial injury. *Circ Cardiovasc Imaging* 2021;14(1):e012220.

Weckbach LT, Uhl A, Boehm F, Seitelberger V, Huber BC, Kania G, Brunner S, Grabmaier U. Blocking LFA-1 Aggravates Cardiac Inflammation in Experimental Autoimmune Myocarditis. *Cells* 2019;8.

Weckbach LT, Grabmaier U, Uhl A, Gess S, Boehm F, Zehrer A, Pick R, Salvermoser M, Czermak T, Pircher J, Sorrelle N, Migliorini M, Strickland DK, Klingel K, Brinkmann V, Abu Abed U, Eriksson U, Massberg S, Brunner S, Walzog B. Midkine drives cardiac inflammation by promoting neutrophil trafficking and NETosis in myocarditis. *J Exp Med* 2019;216:350-68.

Grabmaier U, Kania G, Kreiner J, Grabmeier J, Uhl A, Huber BC, Lackermair K, Herbach N, Todica A, Eriksson U, **Weckbach LT**,* Brunner S.* Soluble Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1) as a Biomarker in the Mouse Model of Experimental Autoimmune Myocarditis (EAM). *PLoS One* 2016;11:e0158299.

2. Einleitung

Die Myokarditis beschreibt eine akute oder chronische Inflammation des Herzens, die häufig durch kardiotrope Viren ausgelöst wird.¹ Eine akute virale Myokarditis kann in eine autoimmunvermittelte Entzündung übergehen und auch nach Eradikation des Virus aufrecht erhalten werden. Die chronische Inflammation des Herzens kann letztlich zu einer fortschreitenden Verschlechterung der Herzfunktion bis zu terminaler Herzinsuffizienz und Notwendigkeit der Transplantation führen. Die durch eine chronische Myokarditis vermittelte Herzinsuffizienz stellt eine Hauptgruppe der nichtischämischen Kardiomyopathien dar. Diese wiederum sind der häufigste Grund für Herztransplantationen.²⁻⁴

Die meisten Einblicke in die Pathogenese der Myokarditis stammen von zwei Mausmodellen, dem Modell der Coxsackievirus B3-vermittelten (CVB3) Myokarditis und dem Modell der Peptidinduzierten Experimentellen Autoimmunmyokarditis (EAM). Das CVB3-Modell stellt dabei eine akute virale Myokarditis mit nachfolgender Autoimmunmyokarditis dar. Eine pathophysiologische Unterscheidung zwischen einer viral- oder autoimmun-vermittelten Entzündung und Schädigung des Herzens ist hierbei jedoch nicht möglich. Im Gegensatz hierzu repräsentiert das EAM-Modell die postvirale autoimmun-vermittelte Inflammation des Herzens.⁵ Für die Induktion der EAM wird ein kardiales Peptid zusammen mit komplettem Freund-Adjuvans (CFA) appliziert. Dies führt zu einer Autoimmunreaktion gegen das kardiale Gewebe mit einer maximalen Infiltration von Leukozyten an Tag 21 nach Immunisierung. Im weiteren Verlauf entwickeln die Tiere eine Fibrose des Herzens mit Einschränkung der Pumpfunktion.⁶

Die Rolle des adaptiven Immunsystems für die Pathogenese der Myokarditis wurde in den vergangenen Jahrzehnten intensiv untersucht. T-Zellen spielen eine ganz entscheidende Rolle für die Pathogenese der Myokarditis und dienen in endomyokardialen Biopsien (EMB) beim Menschen als entscheidendes histopathologisches Kriterium.⁷ Die EAM ist vor allem ein CD4⁺ T-Zell vermitteltes Entzündungsmodell. Die Depletion von CD4⁺ T-Zellen verhindert die Entstehung einer kardialen Inflammation in der Maus vollständig, während die Abwesenheit von CD8⁺ T-Zellen lediglich zu einer Abschwächung der entzündlichen Antwort im Herzen führt.⁸ Im Gegensatz zur Bedeutung des adaptiven Immunsystems, ist der Einfluss des angeboren Immunsystems und im speziellen von

polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN) weitestgehend unverstanden. Zusätzlich zu klassischen Abwehrmechanismen, können PMN eine chronische Entzündung durch die Freisetzung von sogenannten Neutrophil Extracellular Traps (NETs) aufrechterhalten. Nach Aktivierung, z.B. durch Viren oder andere Trigger, werfen PMN ihre DNA, die mit antimikrobiellen Proteinen bestückt ist, "netzartig" aus.⁹ Verschiedene Studien konnten zeigen, dass NETs möglicherweise eine Verbindung zwischen dem angeborenen und erworbenen Immunsystem darstellen.^{10, 11} Die Bedeutung von NETs für die kardiale Funktion und Fibrose konnte in einem Kardiomyopathie-Modell gezeigt werden, in dem durch Konstriktion der Aorta eine Druckbelastung im linken Ventrikel erzeugt wurde. In der Abwesenheit von NETs war die kardiale Fibrose im Vergleich zur Kontrolle signifikant reduziert.¹² In einem ähnlichen Mausmodell konnte durch Überexpression des Zytokins Midkine (MK) im Vergleich zu Kontrolltieren eine deutlich verstärkte kardiale Fibrose beobachtet werden.¹³ MK scheint wie NETs bei einer durch Druckbelastung-induzierten Kardiomyopathie eine bedeutende Rolle zu spielen. Die funktionelle Bedeutung von MK für die Rekrutierung von PMN wurde durch den Habilitanden im Rahmen seiner Promotionsarbeit untersucht. So konnte er zeigen, dass MK für die Adhäsion und nachfolgende Rekrutierung von PMN in einem akuten Entzündungsmodell der Maus von enormer Bedeutung ist. MK war in der Lage über Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein 1 (LRP1) die hochaffine Konformation von β_2 -Integrinen – Rezeptoren auf PMN, die für die Rekrutierung an den Entzündungsort essenziell sind – zu verstärken.¹⁴ PMN exprimieren v.a. die β_2 -Integrine Lymphocyte Function-associated Antigen 1 (LFA-1, CD18/CD11a) und Macrophage 1-Antigen (Mac-1, CD18/CD11b). Darüber hinaus kann von T-Zellen exprimiertes LFA-1 mit Antigenpräsentierenden Zellen interagieren und dadurch die T-Zell-Aktivierung verstärken. Hier konnte gezeigt werden, dass eine durch LFA-1 ausgelöste Signalweiterleitung die Differenzierung zu Th1-Zellen verstärken und die Generierung von Th17 und regulatorischen T-Zellen supprimieren kann.¹⁵ Adhäsionsmoleküle auf dem Endothel dienen als Liganden für Integrine.¹⁶ Während LFA-1 an Intercellular Adhesion Molecule 1 (ICAM-1) bindet, interagiert Very Late Antigen-4 (VLA-4) -Mitglied der β_1 -Integrin-Familie und vorwiegend exprimiert auf Monozyten – v.a. mit Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1).¹⁶ Die lösliche Form von VCAM-1 (sVCAM-1) zeigt sich bei unterschiedlichen chronischen inflammatorischen Erkrankungen im Serum erhöht und korreliert mit der Entzündungsaktivität.¹⁷

In der vorliegenden Habilitationsarbeit wurde daher untersucht, welche funktionelle Bedeutung MK und PMN durch die Bildung von NETs für die inflammatorische Antwort im Rahmen der Myokarditis besitzen. Darüber hinaus wurde die Rolle des Adhäsionsrezeptors LFA-1 sowie des Adhäsionsliganden VCAM-1 im EAM-Modell im Detail analysiert.

Die Inflammation des myokardialen Gewebes ist im Rahmen der Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus type 2 (SARS-CoV-2)-Pandemie in den Fokus gerückt. Bei einer Vielzahl der Patienten mit Corona-Virus-Erkrankung 2019 (COVID-19) hatte sich neben der vorwiegend respiratorischen Erkrankung eine myokardiale Schädigung – definiert durch erhöhte Troponin-Werte – gezeigt. Die myokardiale Schädigung war hierbei mit einer erhöhten Mortalität assoziiert.¹⁸ Auf der Basis verschiedener Fallberichte wurde eine myokardiale Inflammation als Genese der myokardialen Schädigung propagiert.¹⁹⁻²¹ Um die Ursache der myokardialen Schädigung besser zu verstehen, erfolgte im zweiten Teil der vorliegenden Habilitationsarbeit eine multimodale Charakterisierung und Phänotypisierung des myokardialen Gewebes und der myokardialen Funktion von COVID-19-Patienten.

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1 Die Rolle von NETs für die myokardiale Inflammation im Rahmen der Myokarditis

Vor funktionellen Analysen zur Bedeutung von NETs im Rahmen der EAM wurde das Vorliegen von NETs im myokardialen Gewebe von Patienten mit Myokarditis untersucht.²² In Gewebeproben von 10 von 14 Patienten konnten NETs - definiert durch die Kolokalisation von H2A-H2B-DNA-Komplex, Myeloperoxidase (MPO) und citrulliniertem Histon (H3Cit) - konfokalmikroskopisch detektiert werden (Abb. 1a). Um die funktionelle Bedeutung von NETs für die myokardiale Inflammation im Detail zu untersuchen, wurden im EAM-Modell die Tiere mit DNase (zum Auflösen von NETs) oder Chloramidin (zur Inhibition der Entstehung von NETs) behandelt. Im Vergleich zu Kontrolltieren führte diese Behandlung an Tag 21 nach Immunisierung (dem Höhepunkt der akuten Inflammation) zu einer signifikant verminderten Leukozyteninfiltration – gemessen mittels eines semiquantitativen Einteilungssystems (EAM-Score) - sowie zu einem signifikant geringeren Herz-Körpergewicht-Verhältnis (Abb. 1b, c). Dieses dient neben der Leukozyteninfiltration als Maß für die Ausprägung der Entzündung. Diese Ergebnisse weisen auf eine funktionelle Bedeutung von NETs für die myokardiale Inflammation im EAM-Modell hin. Erwartungsgemäß konnten NETs ebenfalls im myokardialen Gewebe von EAM-Tieren an Tag 21 nachgewiesen werden. Hier wurde die typische Morphologie zusammen mit der Kolokalisation von DNA, Neutrophilen-Elastase (NE) und H3Cit zur Definition von NETs herangezogen (Abb. 1d). Da der Habilitand im Rahmen seiner Promotionsarbeit gezeigt hatte,14 dass das Zytokin MK für die Adhäsion und Rekrutierung von PMN von herausragender Bedeutung ist, wurde MK im EAM-Modell von Beginn der Immunisierung bis Tag 21 mittels eines blockierenden Antikörpers inhibiert, der die N-terminale Domäne von MK bindet (anti-N-MK). In den anti-N-MK behandelten Tieren war im Vergleich zu den Kontrolltieren die Anzahl an infiltrierten PMN signifikant vermindert (Abb. 1e, f). Darüber hinaus war die Anzahl an NET+ PMN ebenfalls signifikant reduziert. Auch der prozentuale Anteil der NET+ von allen infiltrierten PMN war signifikant geringer (Abb. 1g). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass MK über die Rekrutierung hinaus die Bildung von NETs fördert (Abb. 1f).



Abb. 1: NETs sind für die kardiale Inflammation im Rahmen der Myokarditis von funktioneller Bedeutung. (a) Darstellung von NETs in Schnitten einer EMB eines Patienten mit Myokarditis. Leukozyten-Infiltration gemessen mittels des semiquantitativen EAM-Scores (b) sowie Herz-Körpergewicht-Verhältnis (c) nach Applikation von DNase oder Chloramidin von Tag 0 bis Tag 21. Repräsentative Darstellung von NETs in myokardialen Schnitten von immunisierten Mäusen ohne Behandlung (d, EAM + vehicle) sowie nach Inhibition von MK mittels eines blockierenden Antikörpers (e, EAM + anti-N-MK) an Tag 21. Infiltration von PMN (f), von NET+ PMN (g) sowie der prozentuale Anteil der NET+ PMN (h) von allen infiltrierten PMN ins myokardiale Gewebe nach Inhibition von MK im Vergleich zur Vehikel-Kontrolle. Abbildung aus Weckbach et al., J Exp Med, 2019.²²

Durch die Inhibition der N-terminalen Domäne von MK konnte auch die Gesamtleukozyteninfiltration ins myokardiale Gewebe im Vergleich zur Vehikelkontrolle signifikant reduziert werden – semiquantitativ gemessen mit Hilfe des EAM-Scores (Abb. 2a). Passend dazu war das Herz-Körpergewicht-Verhältnis nach MK-Blockade ebenfalls signifikant reduziert (Abb. 2b). Die Inhibition der C-terminalen Domäne von MK hingegen führte zu keiner Veränderung der inflammatorischen Antwort (Daten nicht gezeigt).²² Mittels Immunfluoreszenz konnte MK im entzündeten Herzen an Tag 21 im perivaskulären Raum identifiziert werden (Fig. 2c). Dies könnte auf einen Beitrag von MK zur Rekrutierung von PMN und möglicherweise anderen Immunzellen bei der EAM hinweisen.



Abb. 2: Die N-terminale Domäne von MK ist für die inflammatorische Antwort im Herzen von Bedeutung. (a) Semiquantitativer EAM-Score (b) sowie Herz-Körpergewicht-Verhältnis nach Applikation von anti-N-MK von Tag 0 bis Tag 21. (c) Lokalisation von MK in Schnitten von EAM-Herzen (Tag 21) im Vergleich zur nicht entzündeten Kontrolle (sham). Die repräsentativen Bilder zeigen CD31 (grün), MK (rot), DNA (blau) sowie die Zusammenführung der einzelnen Bilder (merge). Abbildung modifiziert aus Weckbach et al., J Exp Med, 2019.²²

Um die Bedeutung von MK für die fibrotischen Umbauprozesse und die myokardiale Dysfunktion in der chronischen Phase der EAM genauer zu verstehen, wurde MK von Tag 0 bis 21 mittels des blockierenden Antikörpers anti-N-MK – wie oben beschrieben – blockiert. An Tag 63 wurde die Fibrose im myokardialen Gewebe mittels Masson-Trichrom-Färbung gefärbt und quantifiziert. Hierbei konnte eine signifikante Reduktion der Fibrose nach MK-Blockade im Vergleich zur Kontrolle nachgewiesen werden (Abb. 3a, b). Die myokardiale Funktion wurde echokardiographisch untersucht. Dabei war die Verkürzungsfraktion (fractional shortening) sowie die linksventrikuläre Ejektionsfraktion bei EAM-Tieren an Tag 63 im Vergleich zur nicht-immunisierten Kontrolle (sham) signifikant reduziert. Die Blockade von MK von Tag 0 bis Tag 21 konnte die linksventrikuläre

Funktion nicht vollständig, aber partiell erhalten (Abb. 3c, d). Diese Ergebnisse legen nahe, dass MK neben der akuten Entzündung auch die fibrotischen Umbauprozesse und die myokardiale Dysfunktion fördert.



Abb. 3: Die Blockade von MK im Rahmen der akuten Entzündung reduziert die fibrotischen Umbauprozesse und kann teilweise die linksventrikuläre Funktion erhalten. (a) Darstellung der Fibrose in myokardialen Schnitten von nicht-immunisierten Kontrolltieren (sham) sowie immunisierten Tieren ohne (EAM + vehicle) oder nach Blockade von MK (EAM + anti-N-MK). (b) Semiquantitative Erfassung der Fibroselast. (c) Repräsentative echokardiographische Bilder in der kurzen Achse im M-Mode von immunisierten Kontroll-Tieren (EAM + vehicle) oder nach MK-Blockade (EAM + anti-N-MK) an Tag 63. (d) Quantitative Darstellung der Verkürzungsfraktion sowie (e) der linkventrikulären Ejektionsfraktion. Abbildung modifiziert aus Weckbach et al., J Exp Med, 2019.²²

In vorangehenden Arbeiten konnte gezeigt werden, dass MK über LRP1 als Rezeptor auf PMN die hoch-affine Konformation von β_2 -Integrinen vermittelt.¹⁴ Die funktionelle Bedeutung von LRP1 für die Rekrutierung von PMN unter inflammatorischen Bedingungen wurde in postkapillären Venolen mittels Intravitalmikroskopie am entzündeten M. cremaster der Maus in LRP1^{fl/fl}/vav-cre⁺-Tieren (LRP1^{cKO}) untersucht. In diesen Tieren ist LRP1 in Zellen des hämatopoietischen Systems deletiert. 2 Stunden nach intraskrotaler Applikation von Tumornekrosefaktor α war die Adhäsion von Leukozyten in LRP1^{cKO}-Tieren im Vergleich zu LRP1^{fl/fl}/vav-cre-Kontrollmäusen (LRP1^{ctrl}) signifikant reduziert. Das Rollen, evaluiert anhand der Rolling Flux Fraction (rollende Leukozyten im Gefäß / systemische Leukozytenzahl) sowie der Rollgeschwindigkeit, war nicht beeinträchtigt (Abb. 4a, b, c). Die hämodynamischen Parameter waren in beiden Gruppen ähnlich (Abb. 4d). Die morphologische Auswertung der ausgewanderten Zellen zeigte eine signifikante Reduktion von PMN in der Abwesenheit von LRP1 im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 4e). Die Blockade von LRP1 mittels kontinuierlicher Applikation des Inhibitors Receptor-Associated Protein (RAP) im EAM-Modell führte zu einer reduzierten Leukozyteninfiltration an Tag 21 im Vergleich zur Kontrolle.²² Diese Daten zeigen, dass LRP1 für die Rekrutierung von Leukozyten unter inflammatorischen Bedingungen von funktioneller Bedeutung ist.



Abb. 4: LRP1 ist für die Adhäsion und Rekrutierung von Leukoyzten funktionell bedeutsam. (a-d) Intravitalmikroskopische Untersuchung von postkapillären Venolen des M. cremaster 2 Stunden nach intraskrotaler Applikation von Tumornekrosefaktor α in LRP1^{cKO}- im Vergleich zu LRP1^{ctrl}-Tieren. (a) Rolling Flux Fraction. (b) Rollgeschwindigkeit. (c) Adhäsion. (d) Anzahl der untersuchen Tiere und Gefäße sowie hämodynamische Parameter. (e) Histologische Quantifizierung der ausgewanderten Leukozyten. Eos = Eosinophile Granulozyten. Other = Lymphozyten, Monozyten und basophile Granulozyten. Abbildung modifiziert aus Weckbach et al., J Exp Med, 2019.²²

Um untersuchen zu können, ob die MK-vermittelte Adhäsion von PMN^{14, 22} LRP1-abhängig ist, wurden Hoxb8 stem cell factor (SCF)-Zellen aus dem Knochenmark von LRP1^{cKO} (Hoxb8-LRP1^{eKO})sowie LRP1^{etrl} (Hoxb8-LRP1^{etrl})-Tieren generiert. Durch Transduktion des modifizierten Östrogensensitiven Transkriptionsfaktors Hoxb8 können Progenitorzellen aus dem Knochenmark immortalisiert werden. In der Abwesenheit von Östrogen können diese Zellen durch SCF zu PMNähnlichen Zellen ausdifferenziert werden.^{23, 24} Die differenzierten (d)Hoxb8-Zellen zeigen im Hinblick auf Rollen, Adhäsion und Migration im Vergleich zu nativen PMN ein sehr ähnliches Verhalten.²⁵ Die generierten Hoxb8-Zellen wurden durch Mikroflusskammern, die mit P-Selektin, ICAM-1, MK oder dem klassischen pro-inflammatorischen Chemokin CXCL1 beschichtet waren, perfundiert und analysiert. Mittels Stimulated Emission Depletion (STED)-Mikroskopie zeigte sich auf immobilisertem MK (iMK) in adhärenten und migrierenden dHoxb8-LRP1^{etrl}-Zellen eine Kolokalisation sowie ein Clustering von LRP1 und CD11a (Abb. 5a). Während die Adhäsion und die Migration von dHoxb8-LRP1^{cKO}- im Vergleich zu dHoxb8-LRP1^{ctrl}-Zellen auf CXCL1 nicht beeinträchtigt war, waren Adhäsion und Migration in der Abwesenheit von LRP1 auf MKbeschichteten Mikroflusskammern signifikant reduziert (Abb. 5b, c, d). In dHoxb8-Zellen, die aus dem Knochenmark von Mäusen mit nicht-funktionaler membrandistaler intrazellulärer NPxY-Domäne generiert wurden (Hoxb8-LRP1-NPxY^{ki}), war die Adhäsion auf MK im Vergleich zu Kontrollzellen (Hoxb8-LRP1-NPxY^{ctrl}) signifikant reduziert, während sich auf CXCL1 kein Unterschied zeigte (Abb. 5e). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die MK-vermittelte Adhäsion und Migration LRP1abhängig ist und die membrandistale intrazelluläre NPxY-Domäne hierbei eine Rolle spielt.



Abb. 5: Die MK-vermittelte Adhäsion und Migration ist LRP1-abhängig. (a) Darstellung einer adhärenten (obere Reihe) und einer migrierenden (untere Reihe) Hoxb8-LRP1^{ctrl}-Zelle auf iMK. STED-Aufnahmen zeigen die Expression von LRP1 (grün), CD11a (rot), das zusammengeführte Bild (merge, gelb) sowie die Kolokalisation von CD11a und LRP1 (coloc, Pseudofarben). (b) Adhäsion sowie (c, d) Migration von dHoxb8-LRP1^{ctrl}- und dHoxb8-LRP1^{cKO}-Zellen in Mikroflusskammern, die mit P-Selektin, ICAM-1, MK oder CXCL1 beschichtet wurden. n = 3 bzw. 4. (e) Adhäsion von dHoxb8-LRP1-NPxY^{ctrl}- und dHoxb8-LRP1-NPxY^{ki}-Zellen in Mikroflusskammern, die mit P-Selektin, n = 6. Abbildung aus Weckbach et al., J Exp Med, 2019.²²

Da die Anzahl der NETs nach Blockade von MK im EAM-Modell reduziert war (siehe Abb. 1g, h), wurde untersucht, ob MK die Bildung von NETs induzieren kann. In der Anwesenheit von iMK – jedoch nicht von löslichem MK (sMK) – konnten NETs im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle beobachtet werden. Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) diente als bekannter potenter Induktor von NETs als Positivkontrolle (Abb. 6a, b).



Abb. 6: Die MK-vermittelte Bildung von NETs ist LRP1-abhängig. Stimulation von murinen (a) oder humanen (b) isolierten PMN mit sMK, iMK oder PMA im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle. Fadenförmige Morphologie zusammen mit positivem Signal für H3Cit oder MPO zeigen NETs an. (c, d) Bildung von NETs auf iMK in der Abwesenheit von LRP1. Marker, 40 μ m. n = 3. Abbildung aus Weckbach et al., J Exp Med, 2019.²²

Um zu untersuchen, ob die MK-vermittelte Bildung von NETs LRP1-abhängig ist, wurden die bereits oben genannten LRP1-defizienten Hoxb8-Zellen herangezogen (dHoxb8-LRP1^{cKO}, dHoxb8-LRP1^{ctrl}). Während nach PMA-Stimulation die prozentuale Bildung von NETs aus dHoxb8-LRP1^{cKO}- sowie dHoxb8-LRP1^{ctrl}-Zellen vergleichbar war, zeigte sich auf iMK eine signifikant reduzierte Anzahl von NETs in der Abwesenheit von LRP1 im Vergleich zu Kontrollzellen (Abb. 6c, d). Diese Ergebnisse legen nahe, dass die MK-vermittelte Bildung von NETs – wie auch die Adhäsion und Migration – LRP1-abhängig ist. Die Ergebnisse dieser Arbeit sind graphisch in Abbildung 7 dargestellt.



Abb. 7: Graphische Darstellung der Ergebnisse dieser Arbeit. Abbildung aus Weckbach et al., J Exp Med, 2019.²²

3.2 Die Bedeutung von Adhäsionsmolekülen für die inflammatorische Antwort bei der Myokarditis

Wie oben gezeigt, spielen PMN durch die Bildung von NETs eine bedeutende Rolle im Rahmen der kardialen Inflammation im EAM-Modell. Für die Rekrutierung von PMN an den Ort der Entzündung sind β_2 -Integrine von herausragender Bedeutung.¹⁶ Im EAM-Modell wurde LFA-1 mittels eines blockierenden Antikörpers von Tag 0 bis Tag 21 inhibiert.²⁶ In histologischen myokardialen Schnitten von immunisierten Tieren (EAM) zeigte sich – wie zu erwarten – eine signifikant erhöhte Leukozyteninfiltration sowie ein erhöhtes Herzgewicht / Körpergewicht-Verhältnis im Vergleich zur nicht-immunisierten Kontrolle (sham, Abb. 8a, b, c). Die Blockade von LFA-1 aggravierte die Entzündungsreaktion im Vergleich zur PBS- oder Isotypenantikörper-behandelten EAM-Kontrolle signifikant.



Abb. 8: Die Blockade von LFA-1 aggraviert die inflammatorische Antwort bei der EAM. (a) Darstellung der der Leukozyteninfiltration in myokardialen Schnitten an Tag 21 von nicht-immunisierten Kontrolltieren (sham), immunisierten Tieren ohne Behandlung (EAM + PBS), nach Behandlung mit anti-LFA-1-Antikörper (EAM + anti-LFA-1) oder Isotypenantikörper (EAM + isotype ctrl). (b) Semiquantitative Erfassung der Leukozyteninfiltration mittels EAM-Score an Tag 21. (c) Herzgewicht / Körpergewicht-Verhältnis an Tag 21. n = 8 (sham), n = 16 (andere Gruppen). Abbildung aus Weckbach et al., Cells, 2019.²⁶

Bei der durchflusszytometrischen Analyse einzelner Leukozytensubpopulationen zeigte sich nach LFA-1-Blockade eine signifikant erhöhte Anzahl an CD45+, CD4+, CD45/CD11b+, F4-80+ sowie CD45/CD11b/Ly6+ Zellen im myokardialen Gewebe im Vergleich zur PBS- oder Isotypenantikörper-Kontrolle (Abb. 9a-e). Die Analyse der CD45/CD11b/CD133+ Zellen ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen anti-LFA-1-Antikörper- und Isotypenkontroll-Antikörper-Behandlung (Abb. 9f). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Blockade von LFA-1 zu einer gesteigerten Rekrutierung von CD4+ T-Zellen, Monozyten/Makrophagen und PMN ins entzündete Myokard im Rahmen der EAM führt. Der zugrundeliegende Mechanismus für die verstärkte inflammatorische Antwort nach LFA-1-Blockade bleibt unklar. Im Rahmen der T-Zellaktivierung kann LFA-1 die Differenzierung zu Th17-Zellen unterdrücken und zu Th1-Zellen verstärkte.¹⁵ Da Th1-Zellen die dominierende T-Zell-Subpopulation im Rahmen der EAM darstellen,²⁷ könnte das durch LFA-1-Blockade veränderte inflammatorische Milieu möglicherweise die verstärkte Entzündungsantwort erklären. Letztlich ist der Mechanismus des vorliegenden Phänotyps unklar.



Abb. 9: Die Infiltration verschiedener Leukozytensubpopulation wird durch LFA-1-Blockade verstärkt. (a-f) Durchflusszytometrische Analyse verschiedener Leukozytensubpopulation (a: CD45+; b: CD4+, c: CD45/CD11b, d: F4-80+, e: CD45/CD11b/Ly6G+, f: CD45/CD11b/CD133) im entzündeten myokardialen Gewebe an Tag 21. Nicht-immunisierte Kontrolltiere (sham), immunisierte Tiere ohne Behandlung (EAM + PBS), nach Behandlung mit anti-LFA-1-Antikörper (EAM + anti-LFA-1) oder Isotypenantikörper (EAM + isotype ctrl). n = 18 (PBS), n = 17 (andere Gruppen). Abbildung aus Weckbach et al., Cells, 2019.²⁶

Neben ICAM-1, Ligand für LFA-1, fungiert VCAM-1 exprimiert auf dem Endothel vor allem als Ligand für α 4 β 1-Integrine und ist hier für die Leukozytenrekrutierung bedeutsam.¹⁶ Die lösliche Form von VCAM-1 (sVCAM-1) im Serum korrelierte bei verschiedenen chronischen inflammatorischen Erkrankungen mit der Entzündungsaktivität.¹⁷ Daher wurde sVCAM-1 als Biomarker für die inflammatorische Antwort bei der EAM im Detail untersucht.²⁸ Während aus dem Herzen extrahiertes (c)VCAM-1 vor Immunisierung nicht nachweisbar war, konnte cVCAM-1 sowohl in der akuten wie auch in der chronischen Phase der EAM detektiert werden (Abb. 10a). sVCAM-1 war unter basalen Bedingungen bereits im Plasma nachweisbar, zeigte jedoch im Rahmen der Rahmen einen signifikanten Anstieg, der auch in der chronischen Phase persistierte (Abb. 10b).



Abb. 10: cVCAM-1- und sVCAM-1-Werte sind bei EAM erhöht. (a) cVCAM-1- und (b) sVCAM-1-Werte zu unterschiedlichen Zeitpunkten (wie angegeben) nach Immunisierung im Rahmen der EAM. cVCAM-1: n = 3-9; sVCAM-1: n = 6-12. Abbildung aus Weckbach et al., PloS One, 2016.²⁸

In der akuten Phase der EAM (Tag 21) zeigte der EAM-Score keine Korrelation mit den sVCAM-1-Werten im Plasma. In der chronischen Phase an Tag 49 konnte ebenfalls keine signifikante Korrelation zwischen enddiastolischem Volumen sowie linksventrikulärer Ejektionsfraktion – gemessen mittels Positronen-Emissions-Tomographie (PET) – mit sVCAM-1-Werten nachgewiesen werden (Daten sind nicht gezeigt).²⁸ Im Gegensatz dazu korrelierten sVCAM-1-Werte signifikant mit dem Herzgewicht / Körpergewicht-Verhältnis in der chronischen Phase an Tag 49 und Tag 77 (Abb. 11). Ob sVCAM-1 als Biomarker für die entzündliche Aktivität im Rahmen der chronischen myokardialen Inflammation bei Patienten herangezogen werden kann, müssen weitere Studien zeigen.



Abb. 11: sVCAM-1-Werte korrelieren mit dem Herzgewicht / Körpergewicht-Verhältnis bei der EAM. Korrelation an Tag 49 (a) sowie Tag 77 (b). n = 10-12. Abbildung modifiziert aus Grabmaier et al., PloS One, 2016.²⁸

3.3 Die myokardiale Inflammation sowie Funktion im Rahmen von COVID-19

Eine inflammatorische Beteiligung des Herzens wurde im Rahmen der SARS-CoV-2-Infektion bereits zu Beginn der Pandemie postuliert, basierend auf einzelnen Fallberichten.^{19, 21, 29} Ein relevanter Anteil der COVID-Patienten zeigte erhöhte Troponin-Werte als Hinweis auf eine myokardiale Schädigung. Erhöhte Troponin-Werte waren mit einer erhöhten Mortalität assoziiert.³⁰ Die ätiologische Ursache der myokardialen Schädigung war jedoch unzureichend geklärt. Unter der Hypothese einer myokardialen Inflammation wurden COVID-Patienten, die im LMU-Klinikum am Standort Großhadern zwischen März und Mai 2020 hospitalisiert waren, mittels kardialer Magnetresonanztomographie (cMRT) sowie echokardiographisch im Detail untersucht.³¹ Von einigen Patienten wurden EMB entnommen, die histologisch und immunhistochemisch analysiert wurden.

Von 116 evaluierten COVID-Patienten hatten 73 Patienten erhöhte Troponin-Werte als Hinweis auf eine myokardiale Schädigung. 55 Patienten wurden hierbei aus den in Abb. 12 angegebenen Gründen nicht weiter mittels MRT-Bildgebung untersucht. Bei 18 Patienten wurde eine kardiale Bildgebung mittels MRT und Echokardiographie durchgeführt. Von 5 Patienten wurden EMB entnommen.



Abb. 12: Flussdiagramm zeigt Anzahl der Patienten mit myokardialer Schädigung, die weiter untersucht oder ausgeschlossen wurden. Abbildung aus Weckbach et al., Circ Cardiovasc Imaging, 2021.³¹

Die untersuchte Studienkohorte zeigte im kardialen MRT im Median eine normale linksventrikuläre Ejektionsfraktion sowie normale linksventrikuläre Volumina (Abb. 13). Bei 83,3% der untersuchten Patienten stellten sich MR-morphologisch Zeichen der myokardialen Schädigung dar (natives T1, T2, Extracellular Volume [ECV], Late Gadolinium Enhancement [LGE]). Hier zeigte die Schädigung ein für inflammatorische Prozesse typisches nicht-ischämisches Verteilungsmuster (Daten nicht gezeigt).³¹ Darüber hinaus stellte sich bei 38,9% der Patienten ein myokardiales Ödem dar. 38,9% aller untersuchten Patienten erfüllten die Lake-Louise-Kriterien der Myokarditis.³² Diese Ergebnisse zeigen, dass ein hoher Anteil an COVID-19-Patienten mit erhöhten Troponin-Werten MR-morphologisch eine myokardiale Schädigung aufweist. Bei fast 40% der Patienten lässt sich zudem ein myokardiales Ödem nachweisen. Diese Befunde weisen auf eine myokardiale Inflammation bei einem relevanten Anteil der untersuchten COVID-19-Patienten hin.



Abb. 13: Myokardiale Inflammation bei COVID-Patienten. Tabelle zeigt funktionelle sowie morphologische Ergbnisse der cMRT-Untersuchung. Abbildung aus Weckbach et al., Circ Cardiovasc Imaging, 2021.³¹

Um die myokardiale Inflammation im Detail zu untersuchen, wurden EMB von 5 Patienten aus unserem Studienkollektiv im Detail analysiert (Abb. 14). Klinische und prozedurale Daten zur Entnahme der EMB sind in der Tabelle dargestellt. Die immunhistologische Analyse der Biopsien ergab ein Immunzellinfiltration, das vorwiegend aus Makrophagen bestand. Patient 1 zeigte darüber hinaus eine deutliche CD3+ T-Zell-Infiltration und erfüllte daher die immunhistologischen Kriterien der lymphozytären Myokarditis.³³ SARS-CoV-2 RNA konnte in keiner der EMB nachgewiesen werden. Dies könnte durch eine kurze transiente Infektion des myokardialen Gewebes durch SARS-CoV-2 oder auch durch fehlende direkte Infektion des Herzgewebes bedingt sein.



Abb. 14: Tabelle zeigt klinische, prozedurale und immunhistologische Daten zu den Patienten, denen EMB entnommen worden. Abbildung aus Weckbach et al., Circ Cardiovasc Imaging, 2021.³¹

Wie bereits im MRT zeigte sich auch echokardiographisch keine relevante Einschränkung der linksventrikulären Ejektionsfraktion. Im Gegensatz dazu war der linksventrikuläre globale longitudinale Strain in dem untersuchten Patientenkollektiv mittel- bis höhergradig reduziert (-11.2% [-7.6% bis -15.1%], Abb. 14). In einer Follow-up-Untersuchung (im Median 52 Tage nach initialer Untersuchung) zeigte sich eine signifikante Verbesserung des linksventrikulären globalen longitudinalen Strains (-15.6% [-12.5% to -19.6%]. Diese Ergebnisse weisen auf eine transiente Funktionsverschlechterung der myokardialen Funktion im Rahmen von COVID-19 bei Patienten mit myokardialer Schädigung hin.



Abb. 15: Verbesserung der myokardialen Funktion bei Patienten mit COVID-19 in der Follow-Up-Untersuchung. Bei 9 von 12 zeigte sich eine Verbesserung des linksventrikulären globalen longitudinalen Strains. Abbildung aus Weckbach et al., Circ Cardiovasc Imaging, 2021.³¹

Um die ventrikuläre Funktion von Patienten mit COVID-19 im Detail zu charakterisieren, wurde eine umfassende echokardiographische Analyse sowohl von Patienten mit myokardialer Schädigung (18 Patienten, hsTNT+) als auch ohne myokardiale Schädigung (14 Patienten, hsTNT-) durchgeführt. Die myokardiale Dysfunktion wurde in vier verschiedene Gruppen eingeteilt: 1. Keine ventrikuläre Dysfunktion (grün). 2. Univentrikuläre myokardiale Dysfunktion (linkventrikuläre systolische Dysfunktion [LV_{sys}] oder rechtsventrikuläre systolische Dysfunktion [RV_{sys}], blau). 3. Biventrikuläre systolische Dysfunktion ($LV_{sys} + RV_{sys}$) oder linksventrikuläre / rechtsventrikuläre systolische und diastolische Dysfunktion ($LV_{sys} + LV_{dia} / RV_{sys} + LV_{dia}$), pink. 4. Biventrikuläre systolische und linksventrikuläre diastolische Dysfunktion ($LV_{sys} + LV_{dia} / RV_{sys} + LV_{dia} + RV_{sys}$), rot. Während der Großteil der Patienten ohne myokardiale Schädigung keine ventrikuläre Dysfunktion aufwies (64,3%), war bei der Mehrheit der Patienten mit myokardialer Schädigung eine biventrikuläre ($LV_{sys} + RV_{sys}$), linksventrikuläre systolische und diastolische ($LV_{sys} + LV_{dia} + RV_{sys}$) nachzuweisen (88,8%). In der Follow-up-Untersuchung nach 6-10 Wochen verringerte sich dieser Anteil auf 66,7%. Diese Ergebnisse zeigen, dass ein hoher Anteil der

Patienten mit COVID-19 eine myokardiale Dysfunktion des linken und/oder rechten Ventrikels aufweist. Diese ist bei Patienten mit laborchemischer myokardialer Schädigung deutlich stärker ausgeprägt als bei Patienten ohne myokardiale Schädigung. Im kurzfristigen Verlauf zeigt sich bei einem Teil der Patienten eine Verbesserung der myokardialen Funktion.



Abb. 16: Verteilungsmuster der myokardialen Dysfunktion bei Patienten mit COVID-19. Darstellung der Patienten nach Verteilungsmuster der myokardialen Dysfunktion (ohne ventrikuläre Dysfunktion, grün; LV_{sys} oder RV_{sys} , blau; $LV_{sys} + RV_{sys} / LV_{sys} + LV_{dia} / RV_{sys} + LV_{dia}$, pink; $LV_{sys} + LV_{dia} + RV_{sys}$, rot). (a) Verteilungsmuster der myokardialen Dysfunktion aller Patienten (All) sowie Aufteilung nach Patienten ohne myokardiale Schädigung (hsTNT-) und mit myokardialer Schädigung (hsTNT+). (b) Verteilungsmuster im Follow-up 6-10 Wochen nach initialer Untersuchung und akuter Infektion. Abbildung aus Bieber et al., Infection, 2021.³⁴

4. Ausblick

Wie im Rahmen der Arbeiten dieser Habilitation gezeigt wurde, spielen das angeborene Immunsystem und im speziellen PMN und NETs für die myokardiale Inflammation eine entscheidende und wichtige Rolle. Im Rahmen des Sonderforschungsbereich 914 "Trafficking of Immune Cells in Inflammation, Development and Disease", in dem der Habilitand ein Teilprojekt leitet, wird die Bedeutung von MK und PMN für das entzündliche Milieu im Herzen im Detail weiter untersucht. Neben dem EAM-Modell sollen hier auch humane Proben für eine bessere Übertragbarkeit auf das Krankheitsbild der Myokarditis im Menschen verwendet werden. Darüber hinaus wurde die myokardiale Schädigung im Rahmen von COVID-19 klinisch charakterisiert und deren Auswirkung auf die myokardiale Funktion im Detail untersucht. In weiterführenden Studien wird die myokardiale Inflammation in humanen EMB von Patienten mit COVID-19 nun auf zellulärer und molekularer mittels transkriptomischer und proteomischer Analysen phänotypisiert. Diese methodischen Erkenntnisse sollen dann wiederum für die Aufklärung der Mechanismen der Myokarditis eingesetzt werden.

5. Zusammenfassung

Obwohl die Mechanismen der Myokarditis seit Jahrzehnten intensiv erforscht werden, sind diese in weiten Teilen immer noch unzureichend verstanden. Gerade das komplexe Zusammenspiel verschiedener Immunzellen, welches sich im Verlauf der inflammatorischen Antwort ändert, erschwert das Verständnis. Die Heterogenität der Myokarditis beim Menschen sowie die erschwerte und potenziell riskante Zugänglichkeit zu Gewebe stellen für das Verständnis der Erkrankung eine große Herausforderung dar. In der vorliegenden Arbeit konnten PMN und NETs, die auch in humanen EMB von Patienten mit Myokarditis nachgewiesen werden, als funktionell wichtige Akteure der myokardialen Inflammation identifiziert werden. Für MK konnte eine duale Funktion gezeigt werden: Die Rekrutierung von PMN sowie die Förderung der Bildung von NETs. Beide Funktionen werden dabei über LRP1 vermittelt. Die funktionelle Relevanz von MK im Rahmen der EAM konnte dabei sowohl für die Inflammation des Herzens in der akuten Phase wie auch für fibrotischen Umbauprozesse in der chronischen Phase gezeigt werden. Darüber hinaus konnte demonstriert werden, dass MK-vermittelte Rekrutierungsschritte wie Adhäsion und Migration LRP1-abhängig sind. Die Ergebnisse weisen demnach auf eine wichtige Bedeutung von MK, LRP1 und NETs im Rahmen der myokardialen Inflammation im EAM-Modell hin.

PMN wie auch T-Zellen adhärieren an das Endothel u.a. mittels LFA-1 im Rahmen der Rekrutierung vom Blutstrom ins Gewebe.¹⁶ Darüber hinaus führt die Bindung von LFA-1 auf T-Zellen und ICAM-1 auf Antigen-präsentierenden Zellen zu einem ko-stimulatorischen Signal, welches die T-Zell-Aktivierung moduliert.³⁵ Die Blockade von LFA-1 im EAM-Modell führte zu einer deutlich aggravierten inflammatorischen Antwort mit erhöhtem Immunzellinfiltrat bestehend aus Monozyten, Makrophagen, CD4+ T-Zellen und PMN. Die deutlich verstärkte inflammatorische Antwort nach Inhibition des Adhäsionsrezeptors LFA-1 ist überraschend. Weiterführende Studien müssen den zugrunde liegenden Mechanismus genauer aufschlüsseln.

Der Adhäsionsligand VCAM-1 zeigte sich in seiner löslichen Form im Plasma sowohl in der akuten als auch in der chronischen Phase der EAM deutlich erhöht. Eine klare Korrelation mit der Entzündungsaktivität in der akuten Phase konnte nicht gezeigt werden. Jedoch fand sich in der chronischen Phase eine Korrelation zwischen Herzgewicht- / Körpergewichtverhältnis und sVCAM-1

24

Werten im Plasma. Welche Bedeutung sVCAM-1 als Biomarker im Rahmen der Myokarditis bzw. der inflammatorischen nicht-ischämischen Kardiomyopathie besitzt, müssen weiterführende Studien mit humanen Proben zeigen.

Die myokardiale Inflammation als relevante Ursache der myokardialen Schädigung bei COVID-19-Patienten konnte in einer kleinen Kohorte gezeigt werden. Bei einem Großteil der Patienten fanden sich MR-morphologisch Myokarditis-typische nicht-ischämische Schädigungsmuster. Fast 40% der Patienten wiesen darüber hinaus ein myokardiales Ödem auf und erfüllten damit die diagnostischen Kriterien der Myokarditis im MRT. Die immunhistologische Analyse von EMB ergab bei 4 von 5 Patienten ein Makrophagen-dominiertes inflammatorisches Bild ohne relevante Infiltration von CD3+ T-Zellen, die für die histopathologische Diagnose der lymphozytären Myokarditis eine Voraussetzung darstellt.³³ SARS-CoV-2 RNA im myokardialen Gewebe konnte bei keinem der Patienten nachgewiesen werden. Echokardiographische Analysen zeigten im Median eine normale linksventrikuläre Funktion. Im Gegensatz dazu konnte mittels Strain-Analyse eine mittel- bis schwergradige myokardiale Funktionsstörung bei einem Großteil der Patienten mit myokardialer Schädigung gezeigt werden. Neben der eingeschränkten linksventrikulären systolischen Funktionsstörung fand sich eine relevante linksventrikuläre diastolische und rechtsventrikuläre systolische Funktionseinschränkung. Insgesamt traten Funktionsstörungen des linken und/oder rechten Ventrikels bei Patienten ohne myokardiale Schädigung seltener auf. Follow-up-Untersuchungen bei Patienten mit myokardialer Schädigung zeigten 6-10 Wochen nach akuter Infektion bei einem Teil der Patienten eine Verbesserung der myokardialen Funktionsstörung.

6. Literaturverzeichnis

1. Rose NR. Viral myocarditis. *Curr Opin Rheumatol*. Jul 2016;28(4):383-9. doi:10.1097/BOR.00000000000303

2. Stehlik J, Edwards LB, Kucheryavaya AY, et al. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Twenty-eighth Adult Heart Transplant Report--2011. *J Heart Lung Transplant*. Oct 2011;30(10):1078-94. doi:10.1016/j.healun.2011.08.003

3. Weckbach LT, Maurer U, Schramm R, et al. Lower frequency routine surveillance endomyocardial biopsies after heart transplantation. *PLoS One*. 2017;12(8):e0182880. doi:10.1371/journal.pone.0182880

4. McKenna WJ, Maron BJ, Thiene G. Classification, Epidemiology, and Global Burden of Cardiomyopathies. *Circulation research*. Sep 15 2017;121(7):722-730.

doi:10.1161/CIRCRESAHA.117.309711

5. Neu N, Klieber R, Fruhwirth M, Berger P. Cardiac myosin-induced myocarditis as a model of postinfectious autoimmunity. *Eur Heart J*. Aug 1991;12 Suppl D:117-20.

6. Muller AM, Fischer A, Katus HA, Kaya Z. Mouse models of autoimmune diseases - autoimmune myocarditis. *Curr Pharm Des.* 2015;21(18):2498-512.

 Heymans S, Eriksson U, Lehtonen J, Cooper LT, Jr. The Quest for New Approaches in Myocarditis and Inflammatory Cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*. Nov 29 2016;68(21):2348-2364. doi:10.1016/j.jacc.2016.09.937

8. Smith SC, Allen PM. Myosin-induced acute myocarditis is a T cell-mediated disease. *Journal of immunology*. Oct 01 1991;147(7):2141-7.

9. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. Research Support, U.S. Gov't, P.H.S. *Science*. Mar 5 2004;303(5663):1532-5.

doi:10.1126/science.1092385

 Lande R, Ganguly D, Facchinetti V, et al. Neutrophils activate plasmacytoid dendritic cells by releasing self-DNA-peptide complexes in systemic lupus erythematosus. *Sci Transl Med.* Mar 9 2011;3(73):73ra19. doi:10.1126/scitranslmed.3001180

Diana J, Simoni Y, Furio L, et al. Crosstalk between neutrophils, B-1a cells and plasmacytoid dendritic cells initiates autoimmune diabetes. *Nature medicine*. Jan 2013;19(1):65-73. doi:10.1038/nm.3042

12. Martinod K, Witsch T, Erpenbeck L, et al. Peptidylarginine deiminase 4 promotes age-related organ fibrosis. *The Journal of experimental medicine*. Feb 2017;214(2):439-458. doi:10.1084/jem.20160530

13. Netsu S, Shishido T, Kitahara T, et al. Midkine exacerbates pressure overload-induced cardiac remodeling. *Biochemical and biophysical research communications*. Jan 03 2014;443(1):205-10. doi:10.1016/j.bbrc.2013.11.083

14. Weckbach LT, Gola A, Winkelmann M, et al. The cytokine midkine supports neutrophil trafficking during acute inflammation by promoting adhesion via beta2 integrins (CD11/CD18). *Blood.* Mar 20 2014;123(12):1887-96. doi:10.1182/blood-2013-06-510875

Verma NK, Kelleher D. Not Just an Adhesion Molecule: LFA-1 Contact Tunes the T
 Lymphocyte Program. *J Immunol*. Aug 15 2017;199(4):1213-1221. doi:10.4049/jimmunol.1700495

16. Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol*. Sep 2007;7(9):678-89. doi:10.1038/nri2156

17. Lewis MJ, Vyse S, Shields AM, et al. Improved monitoring of clinical response in Systemic Lupus Erythematosus by longitudinal trend in soluble vascular cell adhesion molecule-1. *Arthritis Res Ther.* Jan 8 2016;18:5. doi:10.1186/s13075-015-0896-7

18. Guo T, Fan Y, Chen M, et al. Cardiovascular Implications of Fatal Outcomes of Patients With Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *JAMA Cardiol*. Jul 1 2020;5(7):811-818.

doi:10.1001/jamacardio.2020.1017

19. Hu H, Ma F, Wei X, Fang Y. Coronavirus fulminant myocarditis treated with glucocorticoid and human immunoglobulin. *Eur Heart J*. Jan 7 2021;42(2):206. doi:10.1093/eurheartj/ehaa190

20. Liu PP, Blet A, Smyth D, Li H. The Science Underlying COVID-19: Implications for the Cardiovascular System. *Circulation*. Jul 7 2020;142(1):68-78.

doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.120.047549

21. Inciardi RM, Lupi L, Zaccone G, et al. Cardiac Involvement in a Patient With Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *JAMA Cardiol*. Jul 1 2020;5(7):819-824.

doi:10.1001/jamacardio.2020.1096

22. Weckbach LT, Grabmaier U, Uhl A, et al. Midkine drives cardiac inflammation by promoting neutrophil trafficking and NETosis in myocarditis. *J Exp Med*. Feb 4 2019;216(2):350-368. doi:10.1084/jem.20181102

23. Redecke V, Wu R, Zhou J, et al. Hematopoietic progenitor cell lines with myeloid and lymphoid potential. *Nat Methods*. Aug 2013;10(8):795-803. doi:10.1038/nmeth.2510

24. Wang GG, Calvo KR, Pasillas MP, Sykes DB, Hacker H, Kamps MP. Quantitative production of macrophages or neutrophils ex vivo using conditional Hoxb8. *Nat Methods*. Apr 2006;3(4):287-93. doi:10.1038/nmeth865

25. Zehrer A, Pick R, Salvermoser M, et al. A Fundamental Role of Myh9 for Neutrophil Migration in Innate Immunity. *J Immunol*. Sep 15 2018;201(6):1748-1764.

doi:10.4049/jimmunol.1701400

26. Weckbach LT, Uhl A, Boehm F, et al. Blocking LFA-1 Aggravates Cardiac Inflammation in Experimental Autoimmune Myocarditis. *Cells*. Oct 17 2019;8(10)doi:10.3390/cells8101267

27. Rangachari M, Mauermann N, Marty RR, et al. T-bet negatively regulates autoimmune myocarditis by suppressing local production of interleukin 17. *J Exp Med.* Aug 7 2006;203(8):2009-19. doi:10.1084/jem.20052222

28. Grabmaier U, Kania G, Kreiner J, 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):e0158299. doi:10.1371/journal.pone.0158299

29. Tavazzi G, Pellegrini C, Maurelli M, et al. Myocardial localization of coronavirus in COVID-19 cardiogenic shock. *Eur J Heart Fail*. May 2020;22(5):911-915. doi:10.1002/ejhf.1828

30. Lala A, Johnson KW, Russak AJ, et al. Prevalence and Impact of Myocardial Injury in Patients Hospitalized with COVID-19 Infection. *medRxiv*. Apr 24 2020;doi:10.1101/2020.04.20.20072702

31. Weckbach LT, Curta A, Bieber S, et al. Myocardial Inflammation and Dysfunction in COVID-19-Associated Myocardial Injury. *Circ Cardiovasc Imaging*. Jan 2021;14(1):e012220. doi:10.1161/CIRCIMAGING.120.011713

32. Ferreira VM, Schulz-Menger J, Holmvang G, et al. Cardiovascular Magnetic Resonance in Nonischemic Myocardial Inflammation: Expert Recommendations. *J Am Coll Cardiol*. Dec 18 2018;72(24):3158-3176. doi:10.1016/j.jacc.2018.09.072

33. Caforio AL, Pankuweit S, Arbustini E, 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*. Sep 2013;34(33):2636-48, 2648a-2648d. doi:10.1093/eurheartj/eht210

34. Bieber S, Kraechan A, Hellmuth JC, et al. Left and right ventricular dysfunction in patients with COVID-19-associated myocardial injury. *Infection*. Jan 30 2021;doi:10.1007/s15010-020-01572-8

35. Lebedeva T, Dustin ML, Sykulev Y. ICAM-1 co-stimulates target cells to facilitate antigen presentation. *Curr Opin Immunol*. Jun 2005;17(3):251-8. doi:10.1016/j.coi.2005.04.008

7. Abkürzungsverzeichnis

| anti-N-MK | Antikörper gegen N-terminale Domäne von Midkine |
|-------------------|--|
| CFA | komplettes Freunds-Adjuvans |
| cMRT | kardiale Magnetresonanztomographie |
| COVID-19 | Corona-Virus-Erkrankung 2019 |
| CVB3 | Coxsackievirus B3 |
| cVCAM-1 | kardiales VCAM-1 |
| DCM | Dilatative Kardiomyopathie |
| EAM | Experimentelle Autoimmunmyokarditis |
| EMB | Endomyokardiale Biopsie |
| ECV | Extracellular Volume |
| H3Cit | Citrulliniertes H3 |
| hsTNT | high sensitive Troponin T |
| ICAM-1 | Intercellular Adhesion Molecule-1 |
| iMK | immobilisiertes Midkine |
| LFA-1 | Lymphocyte function-associated antigen 1 |
| LGE | Late gadolinium enhancement |
| LRP1 | Low density lipoprotein receptor-related protein 1 |
| LV _{dia} | Linksventrikuläre diastolische Dysfunktion |
| LVEDV | Linksventrikuläres enddiastolisches Volumen |
| LVEF | Linksventrikuläre Ejektionsfraktion |
| LV _{sys} | Linksventrikuläre systolische Dysfunktion |
| МК | Midkine |
| МРО | Myeloperoxidase |
| NE | Neutrophilen-Elastase |
| NETs | Neutrophil Extracellular Traps |
| РМА | Phorbol-12-myristat-13-acetat |
| PMN | Polymorphkernige neutrophile Granulozyten |

| RAP | Receptor-Associated Protein |
|-------------------|--|
| RV _{sys} | Rechtsventrikuläre systolische Dysfunktion |
| SARS-CoV-2 | Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus type 2 |
| sMK | lösliches Midkine |
| STED | Stimulated Emission Depletion |
| SCF | Stem Cell Factor |
| sVCAM-1 | lösliches VCAM-1 |
| VCAM-1 | Vascular Cell Adhesion Molecule 1 |
| VLA-4 | Very Late Antigen-4 |

8. Danksagung

Mein Dank gilt vor allem meiner Ehefrau Diana, die mich die vielen Jahre auf dem Weg zur Habilitation stets unterstützt hat und mir den Rücken freigehalten hat. Ich danke ebenso meinen Eltern, die mir erst die Möglichkeit einer medizinischen Karriere ermöglicht haben. Ein großer Dank gilt Frau Professorin Barbara Walzog, die als Doktormutter und Mentorin meine wissenschaftliche Laufbahn schon in der Promotion und aber auch in den Jahren danach mit größtem Engagement unterstützt und gefördert hat. Vielen Dank! Darüber hinaus möchte ich meinem Freund und Kollegen Ulrich Grabmaier danken, mit dem ich einen Großteil der wissenschaftlichen Arbeiten konzipiert und durchgeführt habe. Herzlich möchte ich mich bei Herrn Professor Massberg bedanken, der mir an seiner Klinik die Freiräume für wissenschaftliches Arbeiten in großem Umfang ermöglicht hat. Allen Beteiligten auf diesem Wege möchte ich von Herzen danken.

9. Publikationsverzeichnis

1. Originalarbeiten als Erst- oder Letztautor:

Schuttler D*, **Weckbach LT***, Hamm W, Maier F, Kassem S, Schier J, Lackermair K, Brunner S. Effect of acute altitude exposure on ventilatory thresholds in recreational athletes. *Respir Physiol Neurobiol*. Jun 23 2021;293:103723. doi:10.1016/j.resp.2021.103723 **IF: 1,6**

Maurus S*, **Weckbach LT***, Marschner C, Kunz WG, Ricke J, Kazmierczak PM, Bieber S, Brado J, Kraechan A, Hellmuth JC, Hausleiter J, Massberg S, Grabmaier U, Curta A. Differences in Cardiac Magnetic Resonance Imaging Markers Between Patients With COVID-19-associated Myocardial Injury and Patients With Clinically Suspected Myocarditis. *J Thorac Imaging*. Jun 9 2021;doi:10.1097/RTI.00000000000599 **IF: 2,2**

Bieber S, Kraechan A, Hellmuth JC, Muenchhoff M, Scherer C, Schroeder I, Irlbeck M, Kaeaeb S, Massberg S, Hausleiter J, Grabmaier U, Orban M, **Weckbach LT**. Left and right ventricular dysfunction in patients with COVID-19-associated myocardial injury. Infection. Jan 30 2021;doi:10.1007/s15010-020-01572-8 **IF: 2,9**

Weckbach LT, Curta A, Bieber S, Kraechan A, Brado J, Hellmuth JC, Muenchhoff M, Scherer C, Schroeder I, Irlbeck M, Maurus S, Ricke J, Klingel K, Kaab S, Orban M, Massberg S, Hausleiter J, Grabmaier U. Myocardial Inflammation and Dysfunction in COVID-19-Associated Myocardial Injury. Circ Cardiovasc Imaging. Jan 2021;14(1):e012220. doi:10.1161/CIRCIMAGING.120.011713 IF: 5,7

Werner AC*, **Weckbach LT***, Salvermoser M, Pitter B, Cao J, Maier-Begandt D, Forne I, Schnittler HJ, Walzog B, Montanez E. Coronin 1B Controls Endothelial Actin Dynamics at Cell-Cell Junctions and Is Required for Endothelial Network Assembly. *Front Cell Dev Biol* 2020;8:708. **IF: 5,2**

Grabmaier U, Rizas KD, Massberg S, **Weckbach L**,* Fischer M,* German Resuscitation Registry Study G. Association of prehospital acetylsalicylic acid and heparin administration with favorable neurological outcome after out-of-hospital cardiac arrest: a matched cohort analysis of the German Resuscitation Registry. Intensive Care Med 2020. **IF: 17,7**

Weckbach LT, Uhl A, Boehm F, Seitelberger V, Huber BC, Kania G, Brunner S, Grabmaier U. Blocking LFA-1 Aggravates Cardiac Inflammation in Experimental Autoimmune Myocarditis. Cells 2019;8.

IF: 4,4

Weckbach LT, Kassem S, Maier F, Hamm W, Schuttler D, Kellnar A, Lackermair K, Brunner S. Impact of Acute Altitude Exposure on Lactate Threshold. High Alt Med Biol 2019;20:322-3. IF: 1,4

Weckbach LT, Grabmaier U, Uhl A, Gess S, Boehm F, Zehrer A, Pick R, Salvermoser M, Czermak T, Pircher J, Sorrelle N, Migliorini M, Strickland DK, Klingel K, Brinkmann V, Abu Abed U, Eriksson U, Massberg S, Brunner S, Walzog B. Midkine drives cardiac inflammation by promoting neutrophil trafficking and NETosis in myocarditis. J Exp Med 2019;216:350-68. **IF: 11,7**

Grabmaier U, Rizas KD, Berghof J, Huflaender Y, Wiegers C, Wakili R, Kaspar M, Angstwurm M, Massberg S, **Weckbach LT**,* Brunner S.* Association between survival and non-selective prehospital aspirin and heparin administration in patients with out-of-hospital cardiac arrest: a propensity score-matched analysis. Intensive Care Med 2018;44:537-9. **IF: 19,0**

Weckbach LT, Maurer U, Schramm R, Huber BC, Lackermair K, Weiss M, Meiser B, Hagl C, Massberg S, Eifert S, Grabmaier U. Lower frequency routine surveillance endomyocardial biopsies after heart transplantation. PLoS One 2017;12:e0182880. IF: 2,8

Grabmaier U, Kania G, Kreiner J, Grabmeier J, Uhl A, Huber BC, Lackermair K, Herbach N, Todica A, Eriksson U, **Weckbach LT**,* Brunner S. Soluble Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1) as a Biomarker in the Mouse Model of Experimental Autoimmune Myocarditis (EAM). PLoS One 2016;11:e0158299. **IF: 2,8**

Weckbach LT, Gola A, Winkelmann M, Jakob SM, Groesser L, Borgolte J, Pogoda F, Pick R, Pruenster M, Muller-Hocker J, Deindl E, Sperandio M, Walzog B. The cytokine midkine supports neutrophil trafficking during acute inflammation by promoting adhesion via beta2 integrins (CD11/CD18). Blood 2014;123:1887-96. IF: 10,5

Weckbach LT, Groesser L, Borgolte J, Pagel JI, Pogoda F, Schymeinsky J, Muller-Hocker J, Shakibaei M, Muramatsu T, Deindl E, Walzog B. Midkine acts as proangiogenic cytokine in hypoxiainduced angiogenesis. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2012;303:H429-38. **IF: 3,6**

2. Originalarbeiten als Ko-Autor:

Hahn RT, **Weckbach LT**, Noack T, Hamid N, Kitamura M, Bae R, Lurz P, Kodali SK, Sorajja P, Hausleiter J, Nabauer M. Proposal for a Standard Echocardiographic Tricuspid Valve Nomenclature. *JACC Cardiovasc Imaging*. Mar 10 2021;doi:10.1016/j.jcmg.2021.01.012 **IF: 12,7**

Fischer M, Zacherl MJ, Weinberger T, **Weckbach L**, Huber B, Schulz C, Massberg S, Bartenstein P, Lehner S, Todica A. Comparison of metabolic and functional parameters using cardiac 18F-FDG-PET in early to mid-adulthood male and female mice. *EJNMMI Res.* Jan 19 2021;11(1):7. doi:10.1186/s13550-021-00748-z IF: 2,6 Fischer M, Zacherl MJ, **Weckbach L**, Paintmayer L, Weinberger T, Stark K, Massberg S, Bartenstein P, Lehner S, Schulz C, Todica A. Cardiac 18F-FDG Positron Emission Tomography: An Accurate Tool to Monitor In vivo Metabolic and Functional Alterations in Murine Myocardial Infarction. *Front Cardiovasc Med.* 2021;8:656742. doi:10.3389/fcvm.2021.656742 IF: 3,9

Nicolai L, Schiefelbein K, Lipsky S, Leunig A, Hoffknecht M, Pekayvaz K, Raude B, Marx C, Ehrlich A, Pircher J, Zhang Z, Saleh I, Marel AK, Lof A, Petzold T, Lorenz M, Stark K, Pick R, Rosenberger G, **Weckbach L**, Uhl B, Xia S, Reichel CA, Walzog B, Schulz C, Zheden V, Bender M, Li R, Massberg S, Gaertner F. Vascular surveillance by haptotactic blood platelets in inflammation and infection. *Nat Commun* 2020;11:5778. **IF: 12.1**

Hamm W, Kassem S, von Stulpnagel L, Maier F, Klemm M, Schuttler D, Grabher F, **Weckbach LT**, Huber BC, Bauer A, Rizas KD, Brunner S. Deceleration Capacity and Periodic Repolarization Dynamics As Predictors of Acute Mountain Sickness. *High Alt Med Biol* 2020;21:417-22. **IF: 1,4**

Tahir S, Wagner AH, Dietzel S, Mannell H, Pircher J, **Weckbach LT**, Hecker M, Pohl U. Endothelial CD40 Mediates Microvascular von Willebrand Factor-Dependent Platelet Adhesion Inducing Inflammatory Venothrombosis in ADAMTS13 Knockout Mice. *Thromb Haemost* 2020;120:466-76. **IF: 4,4**

Marx C, Novotny J, Salbeck D, Zellner KR, Nicolai L, Pekayvaz K, Kilani B, Stockhausen S, Burgener N, Kupka D, Stocker TJ, **Weckbach LT**, Pircher J, Moser M, Joner M, Desmet W, Adriaenssens T, Neumann FJ, Gerschlick AH, Ten Berg JM, Lorenz M, Stark K. Eosinophil-platelet interactions promote atherosclerosis and stabilize thrombosis with eosinophil extracellular traps. *Blood* 2019;134:1859-72.

IF: 17,5

Zehrer A, Pick R, Salvermoser M, Boda A, Miller M, Stark K, **Weckbach LT**, Walzog B, Begandt D. A Fundamental Role of Myh9 for Neutrophil Migration in Innate Immunity. *J Immunol* 2018;201:1748-64. **IF: 4,7**

Stocker TJ, Orban M, Braun D, Scheck F, **Weckbach LT**, Orban M, Deseive S, Nabauer M, Massberg S, Hausleiter J. Physical Activity and Noninvasive Cardiac Output as Novel Clinical Endpoints After Transcatheter Valve Repair for Severe Tricuspid Regurgitation. *JACC Cardiovasc Interv* 2018;11:2127-9. **IF: 9.5**

Salvermoser M, Pick R, **Weckbach LT**, Zehrer A, Lohr P, Drechsler M, Sperandio M, Soehnlein O, Walzog B. Myosin 1f is specifically required for neutrophil migration in 3D environments during acute inflammation. *Blood* 2018;131:1887-98. **IF: 16,6**

Pick R, Begandt D, Stocker TJ, Salvermoser M, Thome S, Bottcher RT, Montanez E, Harrison U, Forne I, Khandoga AG, Coletti R, **Weckbach LT**, Brechtefeld D, Haas R, Imhof A, Massberg S,

Sperandio M, Walzog B. Coronin 1A, a novel player in integrin biology, controls neutrophil trafficking in innate immunity. *Blood* 2017;130:847-58. **IF: 15,1**

Pircher J, Czermak T, Ehrlich A, Eberle C, Gaitzsch E, Margraf A, Grommes J, Saha P, Titova A, Ishikawa-Ankerhold H, Stark K, Petzold T, Stocker T, **Weckbach LT**, Novotny J, Sperandio M, Nieswandt B, Smith A, Mannell H, Walzog B, Horst D, Soehnlein O, Massberg S, Schulz C. Cathelicidins prime platelets to mediate arterial thrombosis and tissue inflammation. *Nat Commun* 2018;9:1523.

IF: 11,9

Lackermair K, Sattler S, Huber BC, Grabmaier U, **Weckbach LT**, Bauer A, Theiss HD, Hausleiter J, Mehilli J, Massberg S, Brunner S. Retrospective analysis of circulatory support with the Impella CP(R) device in patients with therapy refractory cardiogenic shock. *Int J Cardiol* 2016;219:200-3. **IF: 6,2**

Hepper I, Schymeinsky J, **Weckbach LT**, Jakob SM, Frommhold D, Sixt M, Laschinger M, Sperandio M, Walzog B. The mammalian actin-binding protein 1 is critical for spreading and intraluminal crawling of neutrophils under flow conditions. *J Immunol* 2012;188:4590-601. **IF: 5,5**

3. Kasuistiken / Case Reports:

4. Übersichtsartikel / Reviews:

Weckbach LT, Kellnar A, Stremmel C, Stark K, Kaab S. [COVID-19: a cardiological point-of-view]. Dtsch Med Wochenschr 2020;145:1063-7. IF: 0,6

Schuttler D, Clauss S, **Weckbach LT**, Brunner S. Molecular Mechanisms of Cardiac Remodeling and Regeneration in Physical Exercise. *Cells* 2019;8. **IF: 4,4**

Weckbach LT, Preissner KT, Deindl E. The Role of Midkine in Arteriogenesis, Involving Mechanosensing, Endothelial Cell Proliferation, and Vasodilation. *Int J Mol Sci* 2018;19. IF: 2,9

Weckbach LT, Grabmaier U, Clauss S, Wakili R. MicroRNAs as a diagnostic tool for heart failure and atrial fibrillation. *Curr Opin Pharmacol* 2016;27:24-30. IF: 5,4

Weckbach LT, Muramatsu T, Walzog B. Midkine in inflammation. *ScientificWorldJournal* 2011;11:2491-505. IF: 1,7

5. Buchkapitel:

6. Sonstige Veröffentlichungen: