

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

Inhibition der Integrine VLA-4 und LFA-1 im
Mausmodell der experimentellen Autoimmunmyokarditis

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

vorgelegt von
Julia Christina Ramsl, geb. Kreiner
aus Wasserburg a. Inn

Jahr
2023

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Stefan Brunner

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Bernhard Heindl
Prof. Dr. Jens Waschke

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: PD Dr. Ulrich Grabmaier

Dekan: Prof. Dr. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 30.11.2023

Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	Myokarditis.....	1
1.1.1	Epidemiologie der Myokarditis	1
1.1.2	Ätiologie und Formen der Myokarditis.....	1
1.1.3	Klinische Aspekte und Diagnostik der Myokarditis	4
1.1.4	Therapieoptionen der Myokarditis.....	5
1.1.5	Pathophysiologie der Myokarditis	7
1.2	Myokarditis im Tiermodell.....	9
1.2.1	Coxsackie B3-Virus (CVB3) induzierte Myokarditis.....	9
1.2.2	Experimentelle Autoimmunmyokarditis (EAM)	10
1.3	Integrin/CAM-Interaktion: LFA-1/ICAM-1 und VLA-4/VCAM-1	12
1.3.1	Struktur und Eigenschaften.....	12
1.3.2	Rolle der Integrin-/CAM-Interaktion bei der Migration von Leukozyten in entzündetes Gewebe.....	13
1.3.3	Rolle der LFA-1/ICAM-1-Interaktion bei der Aktivierung von T-Zellen	14
1.3.4	Rolle der LFA-1/ICAM-1 und VLA-4/VCAM-1 Interaktion bei Myokarditis und DCM	15
1.3.5	Inhibition der LFA-1/ICAM-1 und VLA-4/VCAM-1-Interaktion als therapeutischer Ansatz	16
2	FRAGESTELLUNG.....	17
3	MATERIAL UND METHODEN.....	18
3.1	Versuchstiere	18
3.1.1	Gesetzliche Rahmenbedingungen	18
3.1.2	Eingesetzte Versuchstiere	18
3.1.3	Haltungsbedingungen.....	18
3.2	Material.....	18
3.2.1	Allgemeine Chemikalien und Lösungsmittel.....	18
3.2.2	Durchflusszytometrie	19
3.2.3	Histologie/Färbungen.....	20
3.2.4	Quantitative Real-time RT-PCR	20
3.2.5	Echokardiographie	21
3.2.6	Pharmaka.....	21
3.2.7	Induktion der EAM	21
3.2.8	Operationszubehör	21
3.2.9	Geräte und sonstige Materialien.....	22

4.1.2.1	CD45+ Zellen	40
4.1.2.2	CD45+/CD11b+ Zellen und CD45+/CD11b+/Gr-1+ Zellen.....	40
4.1.2.3	CD45+/Prominin-1+ Zellen.....	41
4.1.2.4	CD4+ Zellen	42
4.1.2.5	T-regulatorische Zellen.....	43
4.1.2.6	Th1-/ Th2-/ Th17-Zellen.....	43
4.1.3	Evaluation der CD4+ Subpopulationen in der Milz.....	44
4.2	Inhibition der VLA-4/VCAM-1-Interaktion durch Gabe eines VLA-4-Antikörpers ..	46
4.2.1	Evaluation der kardialen Inflammation mittels Histologie	46
4.2.2	Evaluation des entzündlichen kardialen Infiltrates mittels Durchflusszytometrie .	47
4.2.2.1	CD45+ Zellen	47
4.2.2.2	CD45+/CD11b+ Zellen und CD45+/CD11b+/Gr-1+ Zellen.....	49
4.2.2.3	CD45+/Prominin-1+ Zellen.....	50
4.2.2.4	CD4+ Zellen	51
4.2.2.5	T-regulatorische Zellen.....	52
4.2.2.6	Th1-/ Th2-/ Th17-Zellen.....	53
4.2.3	Evaluation der CD4+ Subpopulationen in der Milz.....	54
4.2.4	Analyse des Zytokinmilieus im Herzen durch quantitative Real-time RT-PCR....	55
4.2.5	Analyse des Zytokinmilieus in der Milz durch quantitative Real-time RT-PCR... 58	
4.2.6	Beurteilung der kardialen Funktion mittels Echokardiographie	59
4.2.6.1	Bestimmung von enddiastolischem (EDV) und endsystolischem Volumen (ESV).....	59
4.2.6.2	Bestimmung der linksventrikulären Ejektionsfraktion (LVEF)	60
4.2.6.3	Bestimmung des Fractional Shortening (FS).....	62
4.2.6.4	Bestimmung des Stroke Volume Index (SVI).....	63
4.2.7	Bestimmung der kardialen Fibrosierung an Tag 49 nach VLA-4- Antikörpertherapie	63
5	DISKUSSION.....	66
5.1	EAM als Modell der postinfektiösen Autoimmunmyokarditis und DCM.....	67
5.2	Rolle der Inhibition der LFA-1/ICAM-1-Interaktion bei der EAM	68
5.3	Rolle der Inhibition der VLA-4/VCAM-1-Interaktion bei der EAM	72
5.3.1	Auswirkungen der VLA-4-Antikörpertherapie auf das akute Stadium der EAM..	72
5.3.2	Auswirkungen der VLA-4-Antikörpertherapie auf die kardiale Fibrosierung und die Entwicklung einer DCM	76
5.3.3	Verbesserung der kardialen Funktion durch Blockade von VLA-4.....	77
5.4	Limitationen der Arbeit	79
6	ZUSAMMENFASSUNG	81

7	LITERATURVERZEICHNIS.....	82
8	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	95
9	TABELLENVERZEICHNIS.....	97
10	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	98
11	DANKSAGUNG	100
12	EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG.....	102
13	PUBLIKATIONSLISTE.....	103

1 EINLEITUNG

1.1 Myokarditis

1.1.1 Epidemiologie der Myokarditis

Myokarditis beschreibt eine entzündliche Erkrankung des Herzmuskels [1]. Sie gilt als eine der herausforderndsten Diagnosen in der Kardiologie, was sicherlich vor allem an ihrer sehr variablen klinischen Präsentation liegt, die vom asymptomatischen Verlauf bis zum fulminanten Herzversagen reicht [2-4]. Diese große Bandbreite der klinischen Symptomatik, die sich mit anderen häufiger vorkommenden kardiovaskulären Erkrankungen überschneidet, aber auch das Fehlen von hochspezifischen nicht invasiven Untersuchungsmethoden führen dazu, dass eine Myokarditis zu selten diagnostiziert wird [5, 6]. Dadurch ist es schwierig, genaue Aussagen über die Inzidenz der Erkrankung zu treffen. Postmortale Studien haben ergeben, dass in 8,6% bis 12% der Fälle von plötzlichem Herztod im jungen Erwachsenenalter eine Myokarditis vorliegt [7, 8]. Studien der American Heart Association und des American College of Cardiology zur Folge steht die Myokarditis an dritter Stelle der häufigsten Ursachen eines plötzlichen Herztodes bei jungen Leistungssportlern [9]. Bei den meisten Patienten heilt die akute Entzündungsreaktion des Herzmuskels zwar spontan aus [10]. Bei bis zu 30% der Patienten mit histologisch nachgewiesener Myokarditis entwickelt sich jedoch im Verlauf eine dilatative Kardiomyopathie (DCM), welche durch eine Dilatation und eine eingeschränkte Kontraktilität des linken oder beider Ventrikel charakterisiert ist und als inflammatorische Kardiomyopathie bezeichnet wird [1, 4, 11]. Myokarditis ist damit eine der häufigsten Ursachen einer DCM [12], bei den unter 40-Jährigen stellt sie sogar die führende Ursache einer DCM dar [13]. Trotz des medizinischen Fortschritts bleibt die DCM eine schwer zu therapierende Erkrankung und ist der häufigste Grund für eine Herztransplantation [14]. In einer Studie von Ammirati et al. lag die kardiale Mortalität und Durchführungsrate einer Herztransplantation fünf Jahre nach der Diagnosestellung einer akuten Myokarditis bei 4,1% [15]. All dies verdeutlicht, dass es sich bei der Myokarditis um eine folgenschwere Erkrankung handelt. Trotz anhaltender wissenschaftlicher Fortschritte bleiben hinsichtlich der Pathogenese der Myokarditis und der inflammatorischen Kardiomyopathie Fragen offen und somit sind standardisierte Therapiestrategien weiterhin limitiert [16].

1.1.2 Ätiologie und Formen der Myokarditis

Eine Myokarditis kann durch verschiedene infektiöse und nicht infektiöse Ursachen ausgelöst werden, in vielen Fällen bleibt die Ätiologie jedoch auch ungeklärt [13, 17]. In Nordamerika und Europa stehen Viruserkrankungen an erster Stelle [3, 18]. Zunächst galten vor allem Enteroviren, besonders Coxsackie-B-Viren, als die häufigsten viralen Auslöser der Myokarditis

[19, 20]. Später wurden vermehrt Parvovirus B19 und humanes Herpesvirus 6 mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) in Gewebebiopsien von Myokarditispatienten nachgewiesen [21, 22]. Neben den Viruserkrankungen gibt es auch andere infektiöse Ursachen. Hierzu zählen bakterielle Infektionen beispielsweise durch *Borrelia burgdorferi*, *Corynebacterium diphtheriae* oder Chlamydien, aber auch Pilze, Parasiten und Protozoen wie *Trypanosoma cruzi* [23]. Bei letzterem handelt es sich um den Erreger der Chagas-Krankheit, welche eine der häufigsten Ursachen einer Myokarditis in Teilen von Süd- und Zentralamerika repräsentiert [24].

Weiterhin gibt es zahlreiche nicht infektiöse Ursachen einer Herzmuskelentzündung. Dazu gehört die eosinophile Myokarditis, die durch eine Hypersensitivitätsreaktion auf verschiedene Medikamente oder auch durch Systemerkrankungen wie das Churg-Strauss-Syndrom, das Hypereosinophilie-Syndrom oder Tumorerkrankungen ausgelöst wird [25]. Daneben können auch andere systemische Erkrankungen und Autoimmunerkrankungen wie beispielsweise die Sarkoidose, die rheumatoide Arthritis oder der systemische Lupus erythematoses zu einer Myokarditis führen [3, 25]. Eine eher seltene autoimmun vermittelte Form ist die Riesenzellmyokarditis, die in den meisten Fällen einen fulminanten Verlauf zeigt [26]. Die Tabelle 1 gibt eine Übersicht über die verschiedenen möglichen Auslöser einer Myokarditis.

Ausgehend von ihrer Histopathologie kann die Myokarditis außerdem in eine lymphozytäre, eosinophile und Riesenzellmyokarditis unterschieden werden [6, 27]. Dabei stellt die akut lymphozytäre Myokarditis die häufigste Myokarditis-Form dar, welche in den meisten Fällen durch eine Virusinfektion ausgelöst wird [5, 6].

Tabelle 1: Übersicht über die Ätiologie der Myokarditis, modifiziert nach [17]

Infektiöse Ursachen	
Viren	Picornaviren (Coxsackie A und B, ECHO-Virus, Poliovirus, Hepatitis-Virus), Orthomyxovirus (Influenza), Paramyxovirus (Respiratory Syncytial Virus, Mumps), Togavirus (Rubella), Flavivirus (Dengue-Fieber, Gelbfieber), Adenoviren, Erythrovirus (Parvovirus B19), Herpesviren (Humanes Herpesvirus 6, Cytomegalievirus, Epstein-Barr-Virus, Varicella-Zoster-Virus), HIV
Bakterien	Chlamydien (C.pneumonie/psittacosis), Hämophilus influenzae, Legionellen, Pneumophila, Brucella clostridium, Francisella tularensis, Neisseria meningitis, Mycobacterium (tuberculosis), Salmonellen, Staphylokokken, A-Streptokokken, S. pneumonia, tularemia, tetanus, Syphilis, Vibrio cholerae
Spirochäten	Borrelia recurrentis, Leptospiren, Treponema pallidum
Rickettsien	Coxiella burnetii, R. rickettsii/ prowazekii
Pilze	Actinomyces, Aspergillus, Candida, Cryptococcus, Histoplasma, Nocardia
Protozoen	Entamoeba histolytica, Leishmania, Plasmodium falciparum, Trypanosoma cruzi, Trypanosoma brucei, Toxoplasma gondii
Helminthen	Ascaris, Echinococcus granulosus, Schistosoma, Trichinella spiralis, Wuchereria bancrofti
Nicht-infektiöse Ursachen	
Autoimmunerkrankungen	Dermatomyositis, Morbus Chron, Colitis ulcerosa, Rheumatoide Arthritis, Sjögren Syndrom, Systemischer Lupus erythematodes, Granulomatose mit Polyangiitis, Riesenzellmyokarditis
Medikamentös	Aminophyllin, Amphetamine, Anthrazyklin, Katecholamine, Chloramphenicol, Cocain, Cyclophosphamid, Doxorubicin, 5-Fluoruracil, Mesylate, Phenytoin, Trastuzumab, Zidovudin
Allergisch	Azithromycin, Benzodiazepine, Clozapin, Cephalosporine, Dapsone, Dobutamin, Lithium, Diuretika, Thiazide, Methyldopa, Streptomycin, Sulfonamide, NSAR, Tetracyclin, Tricyclische Antidepressiva
Systemerkrankungen	Churg-Strauss-Syndrom, Kollagenosen, Sarkoidose, Kawasaki, Sklerodermie
Andere	Herzinfarkt, Hypothermie, Transplantatabstoßung, Bestrahlung

1.1.3 Klinische Aspekte und Diagnostik der Myokarditis

Eine Myokarditis kann bei Personen jeden Alters auftreten, am häufigsten sind jedoch junge Erwachsene betroffen [3, 4]. Prinzipiell erkranken Männer häufiger als Frauen [28, 29]. Die klinische Symptomatik einer Myokarditis ist sehr variabel. Häufig treten vor dem Beginn einer Myokarditis erkältungsähnliche Symptome wie Fieber, Hautausschlag, Myalgien oder Arthralgien, Müdigkeit und unspezifische respiratorische oder gastrointestinale Symptome auf [3, 18]. Eine Myokarditis kann sich in Form von Brustschmerzen ähnlich wie bei einer Angina Pectoris, Dyspnoe, Palpitationen, eingeschränkter Leistungsfähigkeit und Synkopen präsentieren [3, 17]. In einer europäischen Studie, die 3055 Patienten mit Verdacht auf akute oder chronische Myokarditis umfasste, litten 72% an Dyspnoe, 32% an thorakalen Schmerzen und 18% an Arrhythmien [30]. Aufgrund der klinischen Variabilität gestaltet sich die Diagnosestellung rein basierend auf der klinischen Symptomatik daher äußerst schwierig.

Auch laborchemische Untersuchungen sind nicht spezifisch. Entzündungsmarker wie die Blutsenkungsgeschwindigkeit, das C-reaktive Protein (CRP) und die Leukozytenzahl können erhöht sein [17]. Als Zeichen einer Schädigung des Herzmuskels kann es zu einem Anstieg der Herzenzyme kommen [31].

Als weitere diagnostische Hilfsmittel dienen das Elektrokardiogramm (EKG), die Echokardiographie und die Magnetresonanztomographie des Herzens. Im EKG zeigen sich häufig infarkttypische Veränderungen, aber auch Leitungsverzögerungen und Arrhythmien können auftreten [23, 32]. Mit Hilfe der Echokardiographie kann die systolische und diastolische Funktion sowie die Ventrikelgröße beurteilt werden, welche zur prognostischen Einschätzung dienen [23]. Zusätzlich können andere Ursachen einer kardialen Dysfunktion wie Herzklappenfehler oder andere Kardiomyopathien ausgeschlossen werden [23]. Als Mittel der ersten Wahl hinsichtlich der nichtinvasiven Diagnostik einer Myokarditis gilt mittlerweile die kardiale Magnetresonanztomographie (MRT) [33, 34]. Mithilfe der Lake Louise Kriterien werden Zeichen einer akuten kardialen Entzündung wie ein kardiales Ödem, eine Hyperämie und eine erhöhte kapilläre Permeabilität sowie die irreversible Schädigung des Myokards durch Nekrose und Fibrose erfasst und somit eine hohe Sensitivität und Spezifität erreicht [33, 35]. Gleichzeitig können Aussagen über die Funktion des Herzens getroffen werden [33].

Das MRT ersetzt jedoch nicht die Endomyokardbiopsie, die weiterhin als Goldstandard in der Diagnostik der Myokarditis gilt [4, 23]. Neben der endgültigen histologischen Diagnosestellung kann mit Hilfe der Biopsie auf die Ätiologie der Erkrankung rückgeschlossen werden, wodurch wiederum bestimmte Therapieformen eingeleitet und Aussagen über die Prognose getroffen werden können [4, 25, 36]. Die histologischen Dallas Kriterien definieren eine akute Myokarditis durch den Nachweis einer leukozytären Infiltration und der Nekrose von Kardiomyozyten [37]. Durch den zusätzlichen Einsatz von immunhistochemischen Methoden

konnte die Sensitivität der Endomyokardbiopsie deutlich verbessert werden [28, 36]. Demzufolge kann die Diagnose einer Myokarditis gestellt werden, wenn im Myokard fokale oder diffuse mononukleäre Zellinfiltrate (T-Zellen und Makrophagen) von > 14 Zellen /mm² und eine erhöhte Expression von Humanen Leukozyten Antigen (HLA)-II-Molekülen nachgewiesen werden können [1, 23]. Obwohl in Studien gezeigt werden konnte, dass die Endomyokardbiopsie, wenn sie von darin erfahrenen Ärzten durchgeführt wird, eine sehr niedrige Komplikationsrate aufweist, wird sie weiterhin eher selten eingesetzt [23, 38, 39]. Während die American Heart Association die Durchführung der Biopsie nur bei limitierten klinischen Szenarios empfiehlt, spricht sich die working group on myocardial and pericardial diseases der europäischen Gesellschaft für Kardiologie dafür aus, diese möglichst früh im Krankheitsverlauf einer Myokarditis durchzuführen, wenn anhand der bisher durchgeführten klinischen Untersuchung der Verdacht auf eine Myokarditis besteht [4, 40].

1.1.4 Therapieoptionen der Myokarditis

Die medikamentöse Herzinsuffizienztherapie stellt weiterhin das Grundprinzip in der Therapie der Myokarditis dar [17, 41]. Dabei richtet sich diese nach den ESC-Richtlinien, die den Einsatz von Diuretika, ACE-Hemmer, Angiotensin-Rezeptor-Antagonisten und Betablocker empfehlen [42]. Neben der medikamentösen Therapie sollte eine Sportkarenz für mindestens 6 Monate eingehalten werden, bis sich die kardiale Funktion wieder erholt hat [4, 23]. Bei Auftreten von symptomatischen Arrhythmien wie ein AV-Block II. oder III. Grades ist die temporäre oder dauerhafte Implantation eines Herzschrittmachers indiziert [23]. Auch der Einsatz eines implantierbaren Kardioverter-Defibrillators (ICD) oder der kardialen Resynchronisationstherapie (CRT) kann unter bestimmten Voraussetzungen angebracht sein [23]. Bei Patienten mit kardiogenem Schock kann der Einsatz einer mechanischen Kreislaufunterstützung in Form der extrakorporalen Membranoxygenierung (ECMO) oder eines Herzunterstützungssystems notwendig werden [3, 43, 44]. Führt weder die medikamentöse Therapie noch die mechanische Kreislaufunterstützung zu einer Besserung der Herzfunktion, bleibt die Herztransplantation die letzte Option [3].

Obwohl in den vergangenen Jahren zahlreiche Studien zu kausalen Therapieansätzen durchgeführt wurden, gibt es weiterhin keine etablierten und standardisierten kausalen Therapiestrategien für die lymphozytäre, meist viral bedingte Myokarditis [6]. Schwerpunkte der durchgeführten Studien waren immunsuppressive und immunmodulatorische Ansätze, Immunadsorption sowie antiinflammatorische Wirkstoffe [23].

In einer kleineren nicht-kontrollierten Studie bei Patienten mit kardialer Dysfunktion und nachgewiesener Persistenz eines viralen Genoms im Myokard konnte durch den Einsatz von Interferon- β eine Elimination des Virus sowie eine deutliche Verbesserung der kardialen

Funktion erreicht werden [45]. Die darauffolgende Placebo-kontrollierte Europaweite BICC-Studie konnte den positiven Effekt der Interferon- β -Therapie nur bedingt bestätigen. Es konnte lediglich eine Verbesserung der NYHA-Klasse sowie der subjektiven Einschätzung der Lebensqualität erzielt werden [46].

Als Immunsuppressiva wurden in Studien vor allem Kortikosteroide, Cyclosporin A, Azathioprin oder eine Kombination aus Kortison und einem der beiden anderen Wirkstoffe eingesetzt [4]. Eine der ersten größeren randomisierten kontrollierten Studien, der Myocarditis Treatment Trial, konnte keinen positiven Effekt einer immunsuppressiven Therapie bei Patienten mit histologisch nachgewiesener Myokarditis und kardialer Dysfunktion zeigen [29]. Weder die linksventrikuläre Funktion noch die Mortalität unterschied sich zwischen der mit Prednisolon und Cyclosporin oder Azathioprin und der mit einem Placebo behandelten Gruppe [29]. Im Gegensatz dazu konnten einige neuere Studien den Nutzen einer immunsuppressiven Therapie auf die kardiale Funktion bei iDCM zeigen [47-49]. Im Unterschied zum Myocarditis Treatment Trial wurde das Patientenkollektiv durch immunhistochemische und molekulare Untersuchungen im Rahmen der Myokardbiopsie vorselektioniert. Eingeschlossen wurden lediglich Patienten mit positiver Immunhistochemie, in deren Biopsien keine virale DNA nachgewiesen werden konnte [48, 49]. Frustaci et al. konnten zeigen, dass vor allem Patienten ohne Nachweis einer viralen DNA in der Myokardbiopsie mit jedoch Nachweis von antikardialen Antikörpern von einer immunsuppressiven Therapie profitierten [50]. Auch eine größere Studie von Merken et al. konnte einen positiven Effekt einer immunsuppressiven Therapie zusätzlich zur Herzinsuffizienztherapie auf das Langzeit-Outcome wie das Herztransplantationsfreie Überleben und die kardiale Funktion bei virusnegativer iDCM belegen [51].

Aufgrund ihres sowohl antiviralen als auch antiinflammatorischen Effekts wurde die Wirksamkeit von intravenösen Immunglobulinen bei Patienten mit DCM oder Myokarditis in einer randomisierten, Placebo-kontrollierten Studie untersucht [52]. Hierbei konnte jedoch keine positive Auswirkung auf die kardiale Funktion belegt werden [52].

Die Immunadsorption beruht auf der Elimination von Autoantikörpern, die gegen kardiale Proteine und Strukturen gerichtet sind und im Blut von Patienten mit Myokarditis und DCM nachgewiesen werden konnten [53]. Kleinere Studien konnten einen positiven Effekt der Immunadsorption sowohl auf die kardiale Funktion als auch auf die myokardiale Inflammation bei der DCM zeigen [54-56]. Es fehlen jedoch große randomisierte, kontrollierte Studien, weshalb es bislang keine einheitlichen Empfehlungen zum Einsatz der Immunadsorption gibt [4].

1.1.5 Pathophysiologie der Myokarditis

Trotz des andauernden Forschungsfortschrittes ist die Pathophysiologie der lymphozytären, meist viral bedingten Myokarditis immer noch nicht bis ins Detail verstanden. Der aktuelle Wissensstandpunkt resultiert größtenteils aus Untersuchungen an verschiedenen murinen Tiermodellen für die Myokarditis [3]. Die Pathogenese der viralen Myokarditis lässt sich vereinfacht in drei Phasen einteilen [25, 57].

Die erste Phase beginnt mit der Aufnahme des Virus in die Kardiomyozyten. Dies erfolgt abhängig vom jeweiligen Virus durch spezifische Rezeptoren, beispielsweise wird das Coxsackie-Virus B über den transmembranösen Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor (CAR) in die Zellen aufgenommen [58]. Die anschließend folgende Virusreplikation und Produktion viraler Proteine führt zu einer zytotoxischen Schädigung des Myokards mit Apoptose und Nekrose der infizierten Kardiomyozyten [25, 57]. Diese akute Phase dauert meist nur wenige Tage an [23, 25]. Neben der direkten Zellschädigung führt das Virus zur Aktivierung des angeborenen Immunsystems [59]. Dazu gehört die Aktivierung von Pathogen erkennenden Toll-Like-Rezeptoren (TLR) und die Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen wie Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), Interleukinen und Interferonen [3, 25].

Die zweite sogenannte subakute Phase ist durch den Ablauf von verschiedenen Immunreaktionen charakterisiert und kann sich über mehrere Wochen bis Monate erstrecken [23]. Dazu gehört die Infiltration des Myokards durch Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) und Makrophagen [41, 57]. Durch die Zerstörung und Lyse von infizierten Kardiomyozyten führen die NK-Zellen zu einer Limitierung der viralen Replikation, gleichzeitig setzen sie erneut proinflammatorische Zytokine frei, die wiederum an der Aktivierung des erworbenen Immunsystems beteiligt sind [57]. Die Infiltration von aktivierten T-Zellen in das Myokard ist die Folge [57]. Erkennen diese ein durch MHC-Moleküle auf der Oberfläche der Kardiomyozyten präsentiertes Viruspartikel, folgt eine Aktivierung und klonale Expansion der T-Zellen [25, 60]. Die zytotoxischen T-Zellen zerstören die infizierten Kardiomyozyten über eine durch Perforin vermittelte Zytolyse oder durch die Produktion von Zytokinen [18, 60]. Zusätzlich führen die T-Zellen zu einer Aktivierung der B-Zellen und zur Produktion von spezifischen Antikörpern [25]. Diese immunologischen Mechanismen sind entscheidend, um die virale Replikation zu limitieren [57].

In der dritten Phase tritt mit der Elimination des Virus beim Großteil der Patienten eine Herunterregulation des Immunsystems ein und damit auch eine Regeneration der linksventrikulären Funktion ohne bleibende Einschränkungen [23]. Unter bestimmten Umständen persistiert die virale DNA im Myokard und es resultiert eine chronische Immunstimulation [17]. Oder aber es kommt trotz erfolgreicher Eliminierung des Virus nicht zu einer adäquaten Beendigung der Immunantwort [60]. In beiden Fällen sind eine persistierende

T-Zell-Aktivierung und chronische Entzündungsaktivität die Folge, die zu einer anhaltenden Schädigung der Myozyten und zunehmende Einschränkung der kontraktile Funktion führt [25, 60]. Einiges spricht dafür, dass die persistierende T-Zell-Aktivierung Folge einer Zellvermittelte Autoimmunität ist, die sich im Rahmen der Virusbekämpfung entwickelt [57]. Ein möglicher Mechanismus ist das Molekulare Mimikry zwischen viralen und myokardspezifischen Antigenen, wie das kardiale Myosin, das dazu führt, dass T-Zellen durch diese körpereigenen Antigene aktiviert werden [60, 61]. Daneben fungiert das Virus als eine Art Adjuvans, in dem es zu einer starken Aktivierung des angeborenen Immunsystems mit Hochregulation der MHC-Moleküle und anderer co-stimulatorischer Signalstoffe sowie einer verstärkten Ausschüttung von Zytokinen führt [6, 62]. Treffen diese Mechanismen auf einen Organismus, der genetisch anfällig für die Entwicklung von Autoimmunreaktionen ist, könnte aus der Immunantwort gegen den Virus eine Autoimmunreaktion entstehen [62]. Auch anhand von Untersuchungen im Tiermodell konnten Rose et al. zeigen, dass der genetische Hintergrund der Tiere für den Krankheitsverlauf der Myokarditis eine Rolle spielt. Von 25 genetisch unterschiedlichen Mausstämmen, die mit einem kardiotropen Coxsackie-Virusstamm infiziert wurden, entwickelten zwar alle Stämme eine akute Myokarditis, zu einer chronischen Myokarditis mit Nachweis von kardialen Auto-Antikörpern kam es jedoch nur bei einzelnen Mausstämmen [63]. Auch im Blut von Patienten mit Myokarditis und DCM konnten autoreaktive Antikörper gegen Strukturen des Myokards nachgewiesen werden, was für die Entwicklung von einer Autoimmunreaktion spricht [64, 65]. Die Antikörper können gegen verschiedene myokardiale Proteine gerichtet sein, am häufigsten jedoch gegen das kardiale Myosin [65, 66].

Diese dritte Phase spiegelt somit eine chronische Entzündungsreaktion im Herzen wider, was letztendlich zum kardialen Remodeling mit Verlust der kardialen Struktur und somit zur Entwicklung einer DCM führt [25]. Vor allem die von den infiltrierenden inflammatorischen Zellen freigesetzten Zytokine spielen hierbei eine entscheidende Rolle [67]. Sie aktivieren verschiedene Matrixmetalloproteinasen (MMPs), welche wiederum durch den Abbau von interstitiellem Kollagen und dem Elastin-Gerüst die Zerstörung der kardialen Struktur bewirken [25, 60]. Gleichzeitig führen bestimmte Zytokine wie Transforming Growth Factor β (TGF- β) über die Aktivierung des Smad-Signalweges zu einer zunehmenden kardialen Fibrosierung [25]. Die Folge ist eine Versteifung der Ventrikel und damit einhergehend eine kardiale Dysfunktion mit voranschreitender Herzinsuffizienz [25, 67].

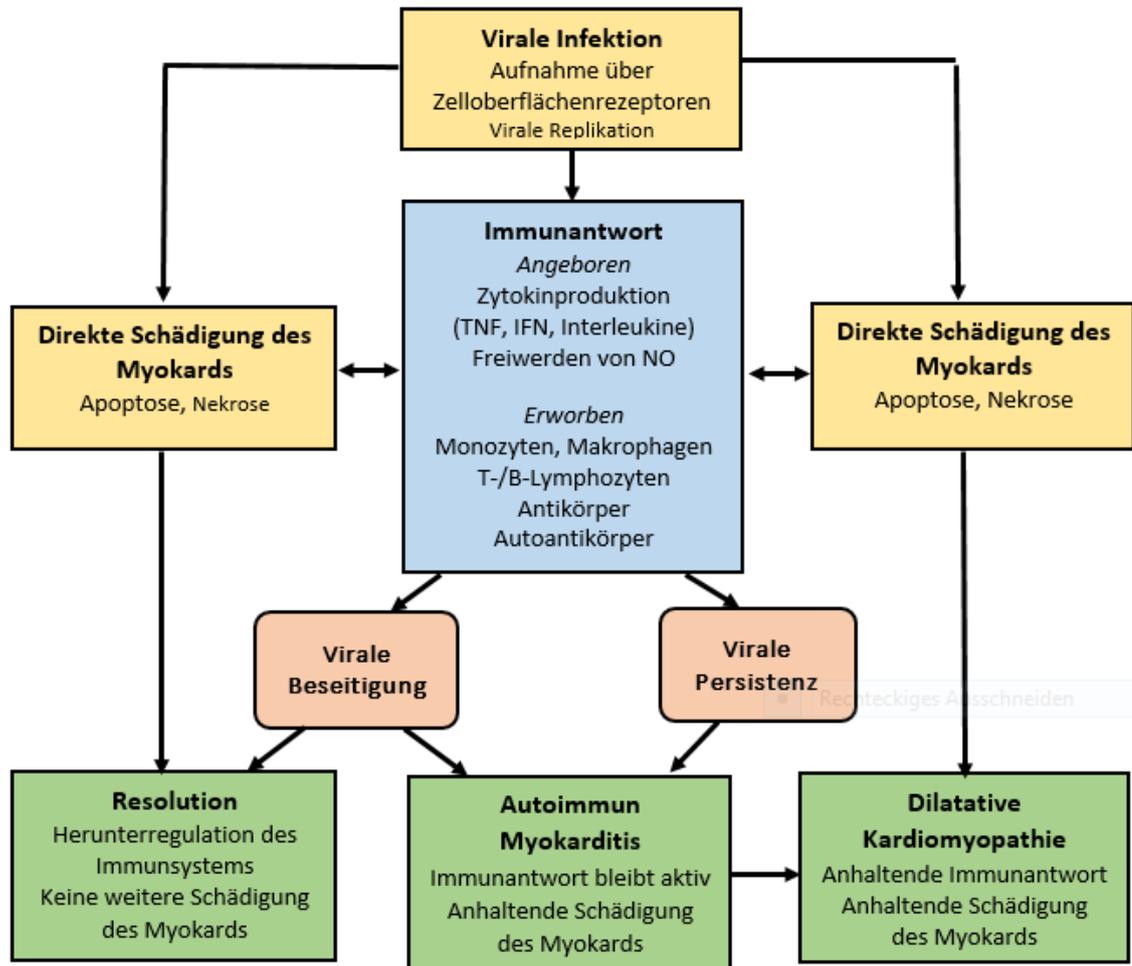


Abbildung 1: Pathogenese der viralen Myokarditis, modifiziert nach [3]

Auslöser der viralen Myokarditis ist eine virale Infektion mit Aufnahme des Virus in die Kardiomyozyten. Sowohl die angeborene als auch erworbene Immunantwort des Organismus spielen eine entscheidende Rolle für die Entwicklung der Myokarditis und der DCM.

1.2 Myokarditis im Tiermodell

Tiermodelle ermöglichen, die Pathogenese und immunologische Abläufe in vivo genauer zu untersuchen und sind somit ein enorm wichtiger Bestandteil von Forschungsarbeiten. Für die Myokarditis existieren einige etablierte Modelle, welche erheblich zum aktuellen Wissen über diese Erkrankung beigetragen haben [68]. Auf die zwei wichtigsten Mausmodelle soll im Folgenden genauer eingegangen werden: das CVB3-Modell und das Modell der EAM.

1.2.1 Coxsackie B3-Virus (CVB3) induzierte Myokarditis

Beim CVB3-Myokarditismodell wird bei den Mäusen durch eine intraperitoneale Injektion von CVB3 eine Myokarditis induziert. Der injizierte Virus wurde aus dem Herzen von zuvor damit infizierten Mäusen gewonnen, wodurch den Versuchstieren mit dem Virus auch kardiales

Myosin verabreicht wird [69]. Alle Mausstämme entwickeln daraufhin in einem Zeitraum von 7 bis 14 Tagen eine akute Myokarditis [68]. Bei bestimmten Mausstämmen wie Balb/c schreitet die akute Phase ab Tag 35 nach der Infizierung in eine chronische Phase fort, die durch große nekrotische und fibrotische Areale des Myokards und die Entwicklung einer DCM charakterisiert ist [69, 70]. Ähnlich wie beim Menschen sind in der chronischen Phase Auto-Antikörper gegen das kardiale Myosin nachweisbar [62]. Dieses Modell macht es somit möglich, immunologische Prozesse von der akuten viralen Infektion bis hin zur Entwicklung der DCM und damit einhergehend postvirale Autoimmunreaktionen in vivo zu untersuchen [6, 69].

1.2.2 Experimentelle Autoimmunmyokarditis (EAM)

Mit dem Mausmodell der experimentellen Autoimmunmyokarditis (EAM) wurde ein virusfreies Modell geschaffen, anhand dessen die Pathophysiologie postinfektiöser Autoimmunreaktionen im Herzen untersucht werden kann [71]. Durch die Immunisierung der Tiere mit kardialem Myosin, welches als das vorwiegende Auto-Antigen in der CVB3-induzierten Myokarditis identifiziert wurde, und Complete Freund's Adjuvant (CFA) wird bei den Mäusen eine Myokarditis induziert, die der chronischen Phase der CVB3-induzierten Myokarditis gleicht [72, 73]. Erfolgt die Immunisierung mit der muskuloskelettalen Isoform des Myosins, entwickeln die Tiere keine Myokarditis [73].

Der zeitliche Verlauf der EAM lässt sich in zwei Phasen einteilen. Nach der zweiten Immunisierung mit kardialem Myosin und CFA an Tag 7 entwickeln die Tiere eine akute Myokarditis, die ihren Höhepunkt an Tag 21 erreicht [74, 75]. In dieser Phase kommt es zu einer Einwanderung von Entzündungszellen in das Myokard, vornehmlich von Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und zu einem geringeren Anteil auch von T- und B-Zellen [76]. Während sich das entzündliche Infiltrat dann zunehmend auflöst, folgen strukturelle Umbauprozesse mit Nekrose der Kardiomyozyten und einer zunehmenden Fibrosierung, was letztendlich zwischen Tag 40 und 60 in einer DCM resultiert [77, 78].

Tabelle 2: Tiermodelle für die Myokarditis, modifiziert nach [68]

	CVB3-Modell	EAM
Überleben	100% bis Tag 90 pi	100% bis Tag 90 pi
Virale Replikation an Tag 7	10 ⁵ PFU/g Herz	0
Myokarditis-Höhepunkt	Tag 10 pi	Tag 21 pi
Myokarditis-Schweregrad	30-60% Inflammation	30-60% Inflammation
Schlüssel-Zellmediatoren	Makrophagen	Makrophagen
Entwicklung einer DCM	Ja	Ja
Geschlechterunterschiede	Männlich > Weiblich	Männlich > Weiblich

PFU: plaque forming units, pi: post Infizierung/post Immunisierung

Wie beim Modell der durch CVB3 induzierten Myokarditis spielt auch bei der EAM der genetische Hintergrund der Tiere für den Krankheitsverlauf eine wichtige Rolle. Mausstämme mit A-Hintergrund wie A.SW, A/J, A.BY, und A.CA entwickeln nach Immunisierung mit Myosin eine Myokarditis, Mausstämme mit B10-Hintergrund wie C57BL/10J nicht [73]. Außerdem konnten lediglich bei Stämmen mit A-Hintergrund nach der Immunisierung Antikörper gegen das kardiale Myosin nachgewiesen werden [79]. Auch nach einer Infektion mit CVB3 sind es die Tiere mit A-Hintergrund, bei welchen die akute Myokarditis nicht ausheilt, sondern in das chronische Stadium übergeht [80].

Für die Pathogenese der EAM sind sowohl zelluläre als auch humorale Immunprozesse entscheidend, auch Zytokine spielen eine wichtige Rolle. Die EAM ist eine durch CD4⁺ T-Zellen vermittelte Erkrankung [81]. Smith et al. konnten zeigen, dass durch den Transfer von CD4⁺ T-Zellen, die aus zuvor mit kardialem Myosin immunisierten Mäusen isoliert wurden, eine Myokarditis in SCID-Mäusen ausgelöst werden kann [82]. Gleichzeitig konnte bei A/J-Mäusen nach antikörpervermittelter Depletion von CD4⁺ T-Zellen keine EAM induziert werden [82]. Anhand von durchflusszytometrischen Untersuchungen wurden sowohl im akuten Stadium der EAM als auch im chronischen Verlauf ein größerer Anteil an CD4⁺ T-Zellen als CD8⁺ T-Zellen nachgewiesen [76]. Dabei müssen die verschiedenen Subklassen der CD4⁺ T-Zellen differenziert betrachtet werden. Afanasyeva et al. konnten zeigen, dass bei der EAM eine Th2-gewichtete Immunantwort abläuft und IL-4 als klassisches Th2-Zytokin die Erkrankung begünstigt [74]. Auch die Subgruppe der Th17-Zellen scheint durch die Produktion von IL-17A an der kardialen Fibrosierung und Progression zur DCM entscheidend beteiligt zu sein [83]. Die auch bei der EAM nachweisbaren herzspezifischen Auto-Antikörper scheinen für die Initiierung der Erkrankung jedoch nicht entscheidend zu sein. Smith et al. konnten zeigen, dass durch den Transfer von Serum mit einem hohen Titer an Anti-Myosin-Antikörper bei SCID-Mäusen keine EAM ausgelöst wird [82]. Neben der adaptiven Immunantwort spielt auch das angeborene Immunsystem in der Pathogenese der EAM eine wichtige Rolle. Die Tatsache, dass für die

Induktion der EAM ein Adjuvans wie CFA notwendig ist, macht dies deutlich. Die im CFA enthaltenen inaktivierten Mykobakterien führen vermutlich über die TLRs zu einer Stimulation des angeborenen Immunsystems [6]. Auch neutrophile Granulozyten, Makrophagen, natürliche Killerzellen und das Komplementsystem sind an der Entstehung der Autoimmunmyokarditis beteiligt [81, 84-86]. Die das Myokard infiltrierende Makrophagen und neutrophilen Granulozyten sind neben den Kardiomyozyten die Hauptquelle von verschiedenen pro- und antiinflammatorischen Zytokinen [67]. Neben einigen anderen sind TNF- α und IL-6, zwei klassische proinflammatorische Zytokine, maßgeblich an der Krankheitsentstehung beteiligt [87-89]. Das profibrotische Zytokin TGF- β spielt eine tragende Rolle im kardialen Remodeling und damit in der Entstehung der DCM [67, 90]. Kania et al. konnten zeigen, dass im Rahmen der EAM CD133+ Progenitorzellen aus dem Knochenmark in das Myokard einwandern und unter dem Einfluss von TGF- β zu Fibroblasten differenzieren, welche wiederum durch die Produktion von extrazellulärer Matrix wie Kollagen maßgeblich zur zunehmenden kardialen Fibrosierung beitragen [90].

1.3 Integrin/CAM-Interaktion: LFA-1/ICAM-1 und VLA-4/VCAM-1

1.3.1 Struktur und Eigenschaften

Zelladhäsionsmoleküle (CAMs) sind integrale Membranproteine, die durch die Vermittlung von Zell-Zell-Kontakten und von Zelladhäsion an die extrazelluläre Matrix eine entscheidende Rolle bei inflammatorischen und immunologischen Vorgängen spielen [91]. Sie können in vier Untergruppen eingeteilt werden: Integrine, Immunglobulin-Superfamilie (Ig-SF), Cadherine und Selektine [92]. Die beiden Oberflächenrezeptoren LFA-1 und VLA-4 gehören zu der Gruppe der Integrine und bestehen jeweils aus einer α - und β -Untereinheit, die nicht kovalent gebunden sind [93]. Beide Untereinheiten sind transmembranöse Glykoproteine mit jeweils einem einzigen hydrophoben Transmembransegment [93]. Integrine verfügen über die wichtige Eigenschaft, dass sie ihren Aktivitätszustand und damit die Bindungsaffinität für ihre Liganden verändern können [94]. Beispielsweise kann eine aktivierte Zelle durch Signale aus dem Zytoplasma eine Konformationsänderung der extrazellulären Domäne ihrer Integrine hervorrufen, wodurch die Bindungsaffinität der Integrine für ihre Liganden erhöht wird. Dieser Vorgang wird als Inside-out-signaling bezeichnet [94]. Andererseits führt die Interaktion zwischen eines Integrins und seines Liganden zur Aktivierung von intrazellulären Prozessen, wie Proliferation oder auch Einleitung der Apoptose, was wiederum als Outside-in-signaling bezeichnet wird [94].

VLA-4 (very-late-antigen-4), welches zur Subgruppe der β 1-Integrine zählt, besteht aus einer α 4- und β 1-Untereinheit und wird auf Monozyten, T- und B-Zellen, basophilen und eosinophilen Granulozyten, jedoch nicht auf neutrophilen Granulozyten exprimiert [91, 92].

Hauptligand von VLA-4 ist das zur Gruppe der Immunglobulin-Superfamilie gehörende VCAM-1, das auf aktivierten Endothelzellen exprimiert wird [92, 95]. VCAM-1 besteht aus bis zu sieben extrazellulär gelegenen Immunglobulin-Domänen, die über Disulfid-Brücken verbunden sind, einer einzigen transmembranösen Domäne und einer 19 Aminosäuren enthaltenden C-terminalen zytoplasmatischen Region [96].

Das zur Gruppe der $\beta 2$ -Integrine zählende LFA-1 (Leucocyte-function-associated-antigen-1) besteht aus einer αL - und $\beta 2$ -Untereinheit und wird auf der Zelloberfläche von allen Leukozyten exprimiert [92]. Sein Hauptligand, ICAM-1, ebenfalls ein transmembranöses Glykoprotein, gehört wie VCAM-1 zur Gruppe der Ig-SF und besteht aus fünf Immunglobulin-Domänen [97]. ICAM-1 wird auf der Oberfläche von Zytokin-stimulierten Zellen wie Leukozyten und Endothelzellen exprimiert [91].

1.3.2 Rolle der Integrin-/CAM-Interaktion bei der Migration von Leukozyten in entzündetes Gewebe

Eine Entzündungsreaktion ist unter anderem durch die Akkumulation von Leukozyten im entzündeten Gewebe charakterisiert. Die dafür notwendige Adhäsion und Migration von Leukozyten wird durch eine komplexe Interaktion von verschiedenen Zelladhäsionsmolekülen auf den Leukozyten und Endothelzellen vermittelt [91], (siehe Abb. 2).

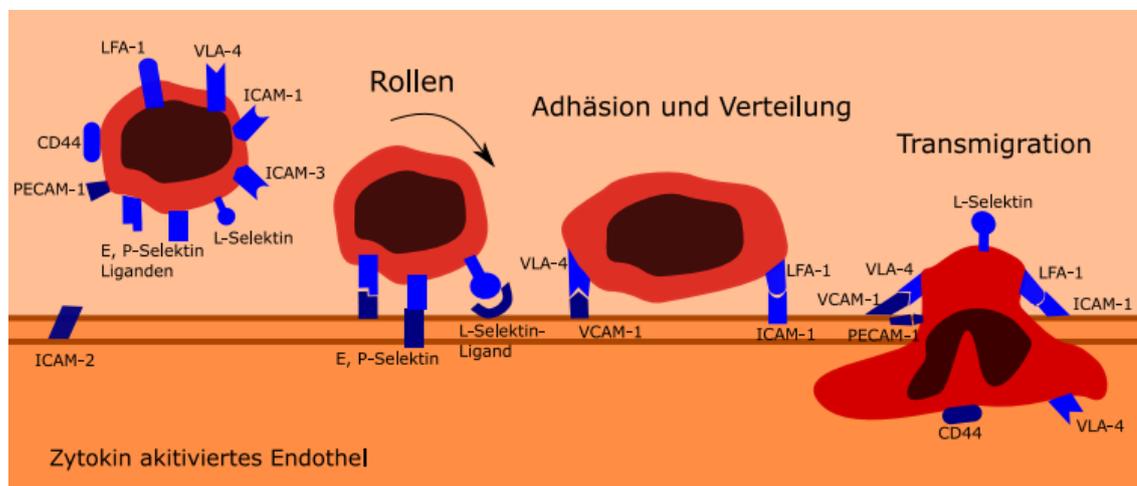


Abbildung 2: Die Rolle von Adhäsionsmolekülen und deren Liganden bei der Migration von Leukozyten in entzündetes Gewebe, modifiziert nach [91]

Die im Blut zirkulierenden Leukozyten binden zunächst an von aktivierten Endothelzellen im entzündeten Gewebe exprimierte Selektine [98]. Aufgrund der eher niedrigen Bindungsaffinität der Selektine kommt es noch nicht zu einer festen Adhäsion, sondern die Leukozyten rollen am Endothel entlang [98]. Während dieses Rollens führen sowohl vom entzündeten Gewebe als auch von den Endothelzellen freigesetzte Entzündungsmediatoren zu einer Aktivierung der weißen Blutzellen, was eine Konformationsänderung der Integrine, vorwiegend LFA-1 und

VLA-4, auf der Leukozytenoberfläche und dadurch eine erhöhte Bindungsaffinität für ihre Liganden auf den Endothelzellen zur Folge hat [92, 98]. Des Weiteren induzieren Entzündungsmediatoren wie TNF- α , IFN- γ und IL-1 eine verstärkte Expression von ICAM-1 und VCAM-1 auf den Endothelzellen [91, 92, 95]. Die Interaktion von LFA-1 mit ICAM-1 sowie VLA-4 mit VCAM-1 führt zur festen Adhäsion der Leukozyten an das Endothel und ermöglicht damit im nächsten Schritt die Transmigration der Leukozyten in das entzündete Gewebe [91, 97].

1.3.3 Rolle der LFA-1/ICAM-1-Interaktion bei der Aktivierung von T-Zellen

LFA-1 und sein Ligand ICAM-1 sind nicht nur an der Migration von Leukozyten sondern auch an der Antigen-spezifischen Aktivierung von T-Zellen beteiligt [91]. Für die Aktivierung von naiven T-Zellen während ihrer Interaktion mit einer Antigen-präsentierenden Zelle (APC) sind zwei Signale notwendig: ein Antigen-spezifisches Signal und ein co-stimulatorisches Signal [97]. Das Antigen-spezifische Signal entsteht, indem die T-Zelle mit ihrem T-Zell-Rezeptor ein durch ein MHC-Molekül präsentiertes Antigen auf der APC bindet [91, 97]. Ohne ein zweites co-stimulatorisches Signal gelangt die T-Zelle in einen Zustand der Anergie [97]. Als co-stimulatorisches Signal kann die Interaktion von LFA-1 auf der T-Zelle und ICAM-1 auf der APC fungieren [91, 97]. Die Bindung von LFA-1 an ICAM-1 führt zu einer festen Adhäsion der T-Zelle an die APC, was für die T-Zell-Aktivierung entscheidend ist [99]. Abhängig davon wodurch das zweite Signal ausgelöst wird, verändert sich das Zytokin-Profil der aktivierten T-Zelle [91].

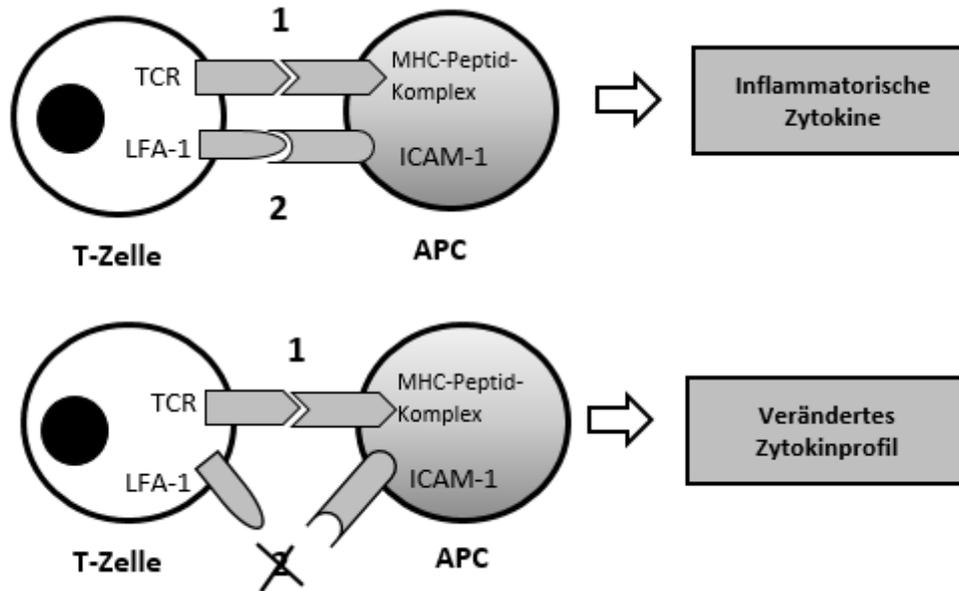


Abbildung 3: Das 2-Signal-Modell bei der T-Zell-Aktivierung, modifiziert nach [91]

Die Erkennung eines von einem MHC-Molekül auf einer Antigen-präsentierenden Zelle (APC) präsentierten Peptid durch den T-Zell-Rezeptor (TCR) dient als erstes Signal (Signal 1). Das zweite Signal kann durch die Interaktion von Zelladhäsionsmolekülen wie LFA-1 und ICAM-1 vermittelt werden (Signal 2). Die Aktivierung beider Signale (Signal 1 und 2) führt zur Freisetzung inflammatorischer T-Zell-spezifischer Zytokine.

1.3.4 Rolle der LFA-1/ICAM-1 und VLA-4/VCAM-1 Interaktion bei Myokarditis und DCM

Wie unter 1.3.2 beschrieben führt eine Entzündungsreaktion im Körper sowohl zur Induktion der ICAM-1- und VCAM-1-Expression auf Endothelzellen als auch zur Aktivierung der Integrine LFA-1 und VLA-4 auf Leukozyten [91]. Somit spielen unter anderem diese Zelladhäsionsmoleküle eine wichtige Rolle bei chronischen Entzündungen und auch Autoimmunreaktionen [91]. So konnte bei verschiedenen chronischen Erkrankungen wie beispielsweise der rheumatoiden Arthritis eine erhöhte Expression von ICAM-1 und VCAM-1 gezeigt werden [100]. Auch im Tiermodell der CVB3 induzierten Myokarditis konnte eine verstärkte Expression von ICAM-1 und VCAM-1 sowohl auf Kardiomyozyten als auch Endothelzellen beobachtet werden [101, 102]. Seko et al. konnten außerdem zeigen, dass die erhöhte CAM-Expression durch die Zytokine TNF- α und IFN- γ , welche wiederum von den das Myokard infiltrierenden Zellen produziert werden, ausgelöst wird [101, 102]. Gleichzeitig konnte bei der viralen Myokarditis auch eine verstärkte Expression von MHC-I-Molekülen auf den Kardiomyozyten nachgewiesen werden [103]. Auch vier Wochen nach der Induktion der viralen Myokarditis durch CVB3 war noch eine erhöhte Expression von MHC-I-Molekülen und ICAM-1 auf den Kardiomyozyten nachweisbar [101, 103]. Diese persistierende simultane

Expression macht es den Kardiomyozyten möglich als Antigen-präsentierenden-Zellen zu fungieren und könnte somit zur anhaltenden Schädigung des Myokards beitragen [101].

1.3.5 Inhibition der LFA-1/ICAM-1 und VLA-4/VCAM-1-Interaktion als therapeutischer Ansatz

Die Bedeutung dieser Adhäsionsproteine im Rahmen von immunologischen Abläufen legt deren Blockade als möglichen Therapieansatz bei chronisch entzündlichen oder Autoimmunerkrankungen nahe und ist mittlerweile bereits in die Klinik eingegangen. Natalizumab, ein humanisierter monoklonaler Antikörper, der gegen die α 4-Untereinheit der beiden Integrine α 4 β 1(VLA-4) und α 4 β 7 (MadCAM-1) gerichtet ist, wurde 2004 von der US Food and Drug Administration zur Therapie der schubförmig verlaufenden Multiplen Sklerose zugelassen [104, 105]. Yednock et al. konnten bereits 1992 für das Tiermodell der Multiplen Sklerose, die experimentelle allergische Encephalitis (EAE), zeigen, dass VLA-4 die Bindung von Leukozyten an das entzündete Endothel im Gehirn vermittelt und die Blockade dieses Integrins die Migration von Leukozyten in das zentrale Nervensystem (ZNS) und damit die Entwicklung einer EAE verhindert [106]. Davon ausgehend konnten zwei große klinische Studien die Wirksamkeit von Natalizumab bei der schubförmig verlaufenden Form der Multiplen Sklerose belegen [107, 108]. Wenige Monate nach der Zulassung musste Natalizumab aufgrund von mehreren Fällen von progressiver multifokaler Leukenzephalopathie (PML) unter der Therapie wieder vom Markt genommen werden [105]. 2006 wurde der Antikörper unter Überwachung der Patienten im Rahmen eines speziellen Programmes wieder zugelassen [109]. Nach positiven Ergebnissen in mehreren klinischen Studien wurde Natalizumab auch bei Patienten mit Morbus Crohn eingesetzt. Die α 4-Integrin-Blockade resultierte in einer erhöhten Remissionsrate sowie einer höheren Lebensqualität [110-112].

Auch für die Blockade der LFA-1/ICAM-1-Interaktion konnten positive Effekte auf den Verlauf von chronisch entzündlichen sowie Autoimmunerkrankungen gezeigt werden. Die intrathekale Gabe sowohl von LFA-1- als auch ICAM-1-Antikörpern führte zu einer verminderten Zellinfiltration in das ZNS und zu einer Unterdrückung der klinischen Zeichen der EAE im Tiermodell [113]. Nach positiven Effekten in mehreren Studien wurde der humanisierte monoklonale Antikörper Efalizumab, der gegen die CD11a-Untereinheit von LFA-1 gerichtet ist, in der Therapie der Psoriasis eingesetzt [114-116]. Der Antikörper musste jedoch 2009 wegen mehrerer Fälle von PML wieder vom Markt genommen werden [117].

2 FRAGESTELLUNG

Die Myokarditis zählt weltweit weiterhin zu den wichtigsten Ursachen einer DCM, welche wiederum der häufigste Grund für eine Herztransplantation darstellt [14, 23]. Trotz Fortschritten im pathophysiologischen Verständnis der Myokarditis existiert weiterhin keine spezifische standardisierte Therapie [23]. Die Interaktion von VLA-4 und VCAM-1 sowie LFA-1 und ICAM-1 spielt im Rahmen von Entzündungsprozessen eine bedeutende Rolle bei der Leukozytenmigration in das entzündete Gewebe [91]. Im Tiermodell der EAE konnte ein positiver Effekt sowohl einer VLA-4- als auch LFA-1-Blockade durch die Reduktion des entzündlichen Infiltrates gezeigt werden [113, 118, 119]. In unserer Arbeitsgruppe wurde erstmals die Interaktion von VLA-4 und VCAM-1 im Mausmodell der EAM untersucht und es konnte ein positiver Effekt einer VLA-4-Antikörper-Therapie auf den Verlauf der Erkrankung und das kardiale Remodeling gezeigt werden [120].

Ziel dieser Arbeit ist es, die Auswirkungen der Inhibition der VLA-4/VCAM-1-Interaktion sowie die Inhibition der LFA-1/ICAM-1-Interaktion durch eine VLA-4- bzw. LFA-1-Antikörpertherapie nun in einem therapeutischen Setting im Mausmodell der EAM zu untersuchen.

Dabei standen folgende Fragen im Vordergrund:

- Hat die Blockade der VLA-4/VCAM-1 sowie der LFA-1/ICAM-1-Interaktion im Modell der EAM einen positiven Effekt auf die akute Entzündung im Myokard?
- Beeinflusst die VLA-4- und LFA-1-Antikörpertherapie die Zusammensetzung des akuten entzündlichen Infiltrates und damit auch die Expression von bestimmten pro- und antiinflammatorischer Zytokinen im Herzen?
- Hat die Blockade von VLA-4 und LFA-1 Auswirkungen auf die Differenzierung der T-Zellen in der Milz? Verändert sich dadurch in der Milz auch die Zytokinexpression im Rahmen der akuten Entzündung?
- Wirkt sich die Antikörpertherapie auch positiv auf das kardiale Remodeling im chronischen Krankheitsverlauf aus und führt sie dadurch zu einer Verbesserung der kardialen Funktion?

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Versuchstiere

3.1.1 Gesetzliche Rahmenbedingungen

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Tierversuche gemäß dem deutschen Tierschutzgesetz (TSchG) §7-9 durchgeführt und von der Regierung von Oberbayern genehmigt (GZ 55.2-1-54-2532-75-11). Die Behandlungen sowie die Organentnahmen wurden in den dafür vorgesehenen und ausgestatteten Räumen des Forschungslabor B der Medizinischen Klinik und Poliklinik I der Ludwig-Maximilians-Universität München am Campus Großhadern durchgeführt.

3.1.2 Eingesetzte Versuchstiere

Alle Versuche wurden mit 6-15 Wochen alten männlichen Wildtyp-Mäusen des Stammes Balb/c durchgeführt. Das durchschnittliche Körpergewicht betrug 20 bis 25g. Alle Tiere wurden über Charles River in Sulzfeld bezogen.

3.1.3 Haltungsbedingungen

Alle Versuchstiere waren im Tierstall des Forschungslabor B der Medizinischen Klinik und Poliklinik der Ludwig-Maximilians-Universität untergebracht. Die Tiere wurden in einer Gruppengröße von 2 bis 4 Mäusen in Standardkäfigen Typ II long auf Holzspäne bei einer konstanten Raumtemperatur von 22° C und einer Luftfeuchtigkeit von ca. 50% gehalten. Steriler Zellstoff diente als Nistmaterial, ein Plastikhäuschen als Rückzugsort. Mittels eines Lichtprogrammes wurde ein 12-Stunden Tag/Nacht-Rhythmus gewährleistet. Futter und Wasser stand den Tieren ad libitum zur Verfügung. Die Käfige wurden regelmäßig gereinigt.

3.2 Material

3.2.1 Allgemeine Chemikalien und Lösungsmittel

Soweit nicht anders vermerkt, wurden alle Chemikalien in höchstem Reinheitsgrad (p.A.-Qualität) vom Hersteller bezogen.

Aqua ad injectabile	B Braun, Melsungen
Aqua dest.	Millipore, Billerica, USA
BSA (bovines Serumalbumin)	Roth, Karlsruhe
Ethanol 96%, vergällt	Roth, Karlsruhe
Ficoll-Paque PLUS	GE Healthcare, Uppsala, Schweden

Formalin (Formaldehyd 4%)	Roth, Karlsruhe
Isotone Natrium-Chlorid-Lösung	B Braun, Melsungen
PBS (Phosphat Buffered Saline)	Invitrogen, Carlsbad, USA
TRIS (hydroxymethyl)-aminomethan	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma, St. Louis, USA

3.2.2 Durchflusszytometrie

BD Falcon Cell Strainer 70 µl	BD Biosciences, Heidelberg
Clenz-Reinigungslösung	Beckman Coulter, Fullerton
Collagenase IV	Gibco, Berlin
Cytofix/Cytoperm Kit plus mit GolgiStop	BD Pharmingen, Heidelberg
DMEM	Sigma, St. Louis, USA
Ethidiumbromid	Sigma, St. Louis, USA
FACS-Röhrchen	Greiner Bio-One, Frickenhausen
FCS	Biochrom, Berlin
Ionomycin	Sigma, St. Louis
Mouse FoxP3 Buffer Set	BD Pharmingen, Heidelberg
PMA (Phorbol 16-Myristate 13-Acetate)	Sigma, St. Louis
Sheath Fluid	Beckman Coulter, Fullerton, USA

Antikörper

Isotyp Kontrolle (PE)	BD Biosciences, Heidelberg
Isotyp Kontrolle (PerCP)	BD Biosciences, Heidelberg
Isotyp Kontrolle (FITC)	BD Biosciences, Heidelberg
CD 4 (FITC; anti-mouse)	BD Biosciences, Heidelberg
CD 3 (PE; anti-mouse)	BD Biosciences, Heidelberg
CD 11b (FITC; anti-mouse)	BD Biosciences, Heidelberg
CD 25 (PerCP; anti-mouse)	eBiosciences, San Diego, USA
CD 45 (PerCP; anti-mouse)	BD Biosciences, Heidelberg
CD 133 (FITC; anti-mouse)	eBiosciences, San Diego, USA
Gr-1 (Ly-6G und Ly6C; PE; anti-mouse)	BD Biosciences, Heidelberg
FoxP3 (PE; anti-mouse)	eBiosciences, San Diego, USA
IL-4 (PE; anti-mouse)	eBiosciences, San Diego, USA
IL-17A (PE; anti-mouse)	BD Biosciences, Heidelberg
IFN-γ (PE; anti-mouse)	BioLegend, San Diego, USA

3.2.3 Histologie/Färbungen

Anilinblau	Merck, Darmstadt
Deckgläser 24 mm x 40 mm	Menzel GmbH & Co. KG, Braunschweig
Einbettkassetten	Engelbrecht, Edermünde
Einbettschälchen	Engelbrecht, Edermünde
Eisenchlorid	Merck, Darmstadt
Eisessig	Sigma, St. Louis, USA
Eosin	Merck, Darmstadt
Essigsäure 0,5%	CNL, Niederhummel
Ethanol	CNL, Niederhummel
Formaldehyd 4%	CNL, Niederhummel
Hämatoxylin	Merck, Darmstadt
HCl-Alkohol 0,5%	CNL, Niederhummel
Histokitt	Hecht, Sondheim
Kernechtrot	Merck, Darmstadt
Mayers Hämalan	Merck, Darmstadt
Mehrzweckgefäß mit Schnappdeckel	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Mikrotomklingen	Engelbrecht, Edermünde
Objektträger 76 mm x 26 mm x 1 mm	Engelbrecht, Edermünde
Paraffin	Engelbrecht, Edermünde
Salzsäure 25%	Neolabb Migge, Heidelberg
Säurefuchsin	Merck, Darmstadt
Wolframatphosphorsäure-Hydrat	Merck, Darmstadt
Xylol	CNL, Niederhummel

3.2.4 Quantitative Real-time RT-PCR

100 bp DNA-Leiter	New England Biolabs, Ipswich, USA
Agarose GTQ	Roth, Karlsruhe
DNase I Amplification Grad Kit	Invitrogen, Carlsbad, USA
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Omniscript RT-Kit (Buffer RT, dNTP 5 mM, Omniskript, RNase-free water)	Quiagen, Hilgen
Primer (18S rRNA, IFN- γ , IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL-17A, TFG- β , TNF- α)	Eurofins Genomics, Hamburg
96-well PCR-Platten nm skited	BioRad, München
RNasin-Inhibitor	Promega, Mannheim

Random-Primer (3 µg/µl)	Invitrogen, Carlsbad, USA
SYBR Green Supermix (Taq-Polymerase, dNTPs, SYBR Green, 6mM MgCl ₂ , PCR Puffer)	BioRad, Hercules, USA
TRI-Reagent	Applied Biosystems, Darmstadt

3.2.5 Echokardiographie

Elektrodengel	C + V Pharmadepot, Versmold
Ultraschallgel	C + V Pharmadepot, Versmold
Veet Enthaarungscreme	Reckitt Benckiser Deutschland, Mannheim
Wattestäbchen	ebelin, dm-drogeriemarkt, Karlsruhe

3.2.6 Pharmaka

Dexpanthenol-Augensalbe	Bayer, Leverkusen
Ketaminhydrochlorid (Ketamin-Inresa 50 mg/ml)	Inresa, Freiburg
Lidocard 2% (Lidocainhydrochlorid)	B Braun, Melsungen
muM17 (anti-mouse-CD11a)	Genentech, San Francisco, USA
Natalizumab (Tysabri)	Biogen Idec, Cambridge, USA
Xylazinhydrochlorid (Rompun 2% Injektionslösung (20 mg/ml))	Bayer, Leverkusen

3.2.7 Induktion der EAM

Complete Freund's Adjuvant	Sigma, St. Louis, USA
Dreiwegehahn	B Braun Melsungen
A-MyHC (Ac-RSLKLMATLFSTYASADR-OH)	Caslo, Lyngby, Dänemark
Pertussis-Toxin	Sigma, St. Louis, USA

3.2.8 Operationszubehör

Baktolin wash	Bode Chemie, Hamburg
Chirurgisches Operationsbesteck	Hugo Sachs Elektronik, March- Hugstetten; FMI Föhr Medical Instruments, Seeheim
Disposable Safety Scalpels	B Braun, Melsungen
Durapore 1,25 cm x 9,1 m	3M Health Care, Neuss

Fine Bore Polythene Tubing 0,28 mm ID, 0,61 mm OD	smiths Medical, Keene, USA
Infrarotlampe	Petra Electric, Burgau
Kaltlichtlampe/Quelle KL 1500 LCD	Carl Zeiss, Jena
Microlance 3 Einmal-Injektions-Kanülen (20 G 0,9 mm x 40 mm, 25 G 0,5 mm x 25 mm, 30 G 0,3 mm x 13mm)	Becton Dickinson, Heidelberg
Schutzhandschuhe unsteril (sempercare)	Semperit, Wien, Österreich
Wärmeplatte mit Rektalkatheter TKM-0902	Föhr Medical Instruments, Seeheim
Zellstofftupfer, 4 cm x 5 cm	MailMed GmbH, Neuenkirchen
Sekundenkleber	UHU GmbH & Co KG, Bühl
Sterilium	Bode Science Center, Hamburg
U-100 Insulinspritzen (BD Micro Fine) 1ml	Becton, Dickinson, Heidelberg

3.2.9 Geräte und sonstige Materialien

Ausgießstation (TBS 88)	Medite GmbH, Burgdorf
Autoklav Varioklav Dampfsterilisation	H+P Labortechnik, Oberschleißheim
Durchflusszytometer Coulter Epics XL- MCL®	Beckman Coulter, Fullerton
Einbettungsautomaten (Autotechnikon, Histomaster 2050/DI)	Bavimed, Birkenau
Elektrophorese E 802 mit Gelkammern	Consort, Turnhout, Belgien
Eppendorf-Cups 1,5 ml/ 2 ml	Eppendorf, Hamburg
Feinwaage CP64-0CE	Sartorius AG, Göttingen
Flasche 500 ml	Schott Duran, Mainz
Gefrierschrank Liebherr Premium	Liebherr, Ochsenhausen
Gel Doc 2000	BioRad, Hercules, USA
Heizblock HTM 130 HLC	BioTech, Bovenden
Infrarotlampe	Petra Electric, Burgau
Inkubator (Hera Cell 240)	Thermo Fisher Scientific
Kühlschrank Liebherr Premium	Liebherr, Ochsenhausen
Mikrotom Microm HM315	Microm International GmbH, Walldorf
NanoDrop-Spektrophotometer	PEQLAB, Erlangen
Petrischalen Steriplan	Roth, Karlsruhe
Photomikroskop M400	Heer, Wildbrugg, Schweiz
Pipetten (2,5 µl/ 20 µl/ 200 µl/1000 µl)	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
Spritzen 1 ml/ 2 ml (BD plastipak®)	Becton Dickinson, Heidelberg

Stereologiesystem

Systemmikroskop	Olympus BX 41, Tokio, Japan
Videokamera	Olympus DP 72, Tokio, Japan
Tischsteuerung	M-SC-DT-3-Tischsteuerung, Märzhäuser Wetzlar GmbH & Co.KG, Wetzlar
Rechner	K & R Computersysteme, München
Flachbildmonitore	HP LP 2065 20“-LCD-Monitor, Palo Alto, USA
Thermocycler MyiQ	BioRad, Hercules, USA
Ultraschallhomogenisator Sonopuls	Bandelin Electronic, Berlin
Vevo2100 imaging system	VisualSonics, Toronto, Canada
Vortex-Genie	Scientific Industries, Bohemia, USA
Wage Scout Pro SPU 204	Ohaus, Giessen
Wärmeschrank	Memmert, Schwabach
Wasserbad	Daglef Patz, Wankendorf
Zentrifuge EBA 12R	Hettich, Bäch, Schweiz
Zentrifuge Multifuge 3 L-R	Heraeus Holding, Hanau
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz

3.2.10 Software

Adobe Photoshop 7.0	Adobe, San Jose, USA
FACS Software Expo 32 ADC	Beckman Coulter, Fullerton, USA
newCAST™	Visiopharm, Hoersholm, Dänemark

3.3 Methoden**3.3.1 Versuchsaufbau**

Die Induktion der EAM erfolgte mit dem für die Maus spezifischen kardialen Myosinpeptid (α MyHC) sowie den Adjuvantien Complete Freund's Adjuvant (CFA) und Pertussistoxin. Die Immunisierung der Tiere erfolgte wie unter 3.3.2 beschrieben an Tag 0 und Tag 7, was zur Entwicklung einer akuten Myokarditis mit Höhepunkt der Entzündungsreaktion an Tag 21 führte. Davon ausgehend schritt die Erkrankung bis zum Tag 49 in das chronische Stadium voran. Nach der Immunisierung wurden die Tiere randomisiert in die Kontrollgruppe und die zwei Versuchsgruppen aufgeteilt, wobei die Gruppenanzahl der Tiere je nach geplantem Analyseverfahren variierte. Die Applikation des VLA-4-Antikörpers sowie des LFA-1-

Antikörper erfolgten an Tag 14 und Tag 18 nach der ersten Immunisierung. Da sich ab Tag 14 ein inflammatorisches Infiltrat im Herzen ausbildet, wurde mit der Wahl dieses Therapiezeitpunktes der frühestmögliche therapeutische Ansatz nachempfunden [76].

Um die Auswirkungen der Antikörpertherapie im akuten Stadium zu untersuchen, wurden die Tiere an Tag 21 sachgerecht getötet, Herz sowie Milz entnommen und untersucht. Für die Analysen im chronischen Stadium wurde die kardiale Funktion mittels Kleintierechokardiographie an Tag 49 evaluiert. Anschließend wurden nach sachgerechter Tötung der Versuchstiere die Herzen entnommen und histologisch aufgearbeitet.

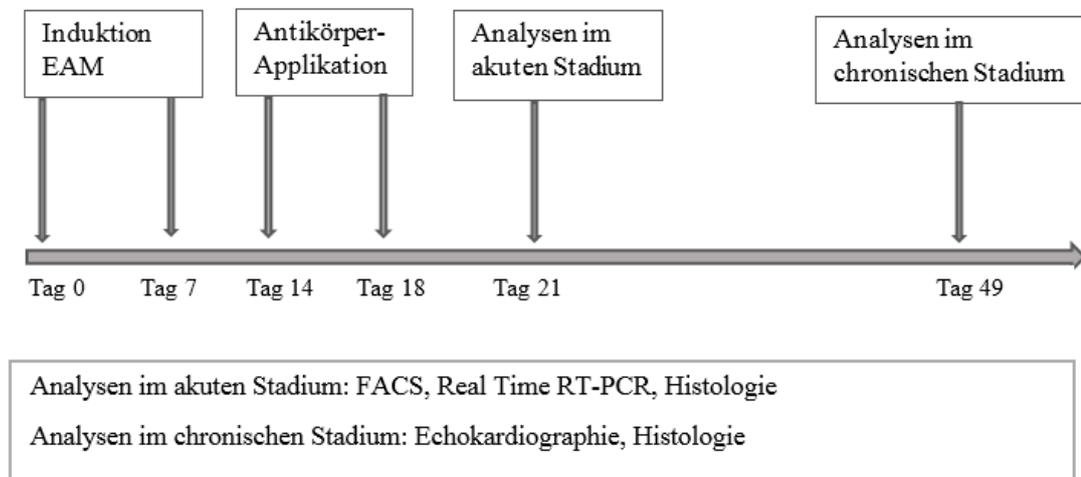


Abbildung 4: Zeitlicher Ablauf des Versuchsaufbaus

Die Versuchstiere wurden an Tag 0 und Tag 7 immunisiert, an Tag 14 und Tag 18 erfolgte die Behandlung mit dem VLA-4 oder LFA-1-Antikörper. Als Kontrolle dienten immunisierte, unbehandelte Mäuse. Die Auswirkungen der Antikörpertherapie auf das akute Entzündungsgeschehen erfolgt mittels Histologie, FACS und quantitativer Real time RT-PCR an Tag 21. Die Auswirkungen auf die kardiale Funktion und das Remodeling wurde an Tag 49 durch die Echokardiographie und histologische Fibrosebestimmung untersucht.

3.3.2 Tiermodell der EAM

Für die vorliegende Arbeit wurde das Mausmodell der experimentellen Autoimmunmyokarditis verwendet, das sich international zur Untersuchung von postinfektiösen Autoimmunreaktionen im Herzen etabliert hat [71]. Die Induktion der EAM erfolgt durch das murine herzspezifische Myosinpeptid α MyHC sowie den Adjuvantien Complete Freund's Adjuvant (CFA) und Pertussistoxin. Dazu wurden 1,6 mg des murinen kardialen Myosinpeptides (Ac-RSLKLMATLFSTYASADR-OH), das einem Teil der schweren Kette des α Myosins entspricht, vorsichtig in 0,8 ml CFA gelöst. Nachdem sich das Peptid vollständig aufgelöst hatte, wurde die Mischung in eine 5 ml-Spritze aufgezogen und zusammen mit einer weiteren 5 ml-Spritze, die die gleiche Menge an PBS enthielt, an ein Dreivegehahn-System angeschlossen.

Beide Substanzen wurden vorsichtig vermischt, um keine Luftblasen zu produzieren, die zu einer Denaturierung des Peptides führen könnten. Das Mischen erfolgte so lange, bis durch eine plötzliche Erhöhung des Widerstandes das Erreichen der richtigen Konsistenz angezeigt wurde.

Die Immunisierung wurde bei 6-8 Wochen alten Balb/c Mäusen durchgeführt. Dazu wurde die Peptidmischung in eine 1 ml-Spritze aufgezogen und jeder Maus wurden 200 µl subkutan (s.c.) in die rechte Inguinalregion injiziert. Als Korrelat der erfolgreichen Applikation zeigte sich eine deutlich sichtbare runde Vorwölbung im Bereich der Injektion. Die Immunisierung wurde sieben Tage später demselben Protokoll folgend wiederholt. Dabei erfolgte die Applikation in die linke Inguinalregion.

Um die Myokarditisinzidenz zu erhöhen, wurde den Mäusen an Tag 0 vor der ersten Immunisierung 400 ng Pertussistoxin intraperitoneal (i.p.) appliziert. Dazu wurde das Toxin in 200 µl destilliertem Wasser, 0.015 M Tris, 0.5 M NaCl, und 0.017% (v/v) Triton X-100 (pH 7.5) gelöst. Bereits Smith et al. fügten Pertussistoxin zum Immunisierungsprotokoll hinzu, da eine höhere Krankheitsinzidenz bei den Versuchstieren erreicht werden konnte [82].

3.3.3 Antikörperbehandlung

3.3.3.1 VLA-4-Antikörper

Im vorliegenden Versuchsdesign erfolgte die Applikation des VLA-4-Antikörpers in einer Dosierung von 10 µg/g Körpergewicht jeweils an Tag 14 und Tag 18 intravenös in die Schwanzvene. Um die Punktion so wenig belastend wie möglich für die Tiere zu gestalten, wurden sie durch eine intraperitoneale Injektion von Xylazin und Ketamin in eine kurze Gewichts-adaptierte Narkose gelegt. Zur Kontrolle und Aufrechterhaltung der Körpertemperatur wurde die Maus auf einer Wärmeplatte mit Klebestreifen fixiert. Die Augen wurden mit Bepanthen-Augensalbe vor Austrocknung geschützt. Zur Vereinfachung der Punktion wurden die Schwanzvenen durch warmes Wasser und Desinfektionsmittel dilatiert. Die Punktion erfolgte mit einer 30G-Kanüle, die an ein kurzes Katheterschlauchsystem angeschlossen war. Um die intravasale Lage des Katheters zu verifizieren, wurde er zunächst mit physiologischer Kochsalzlösung gespült. Bei korrekter Katheterlage wurde der VLA-4-Antikörper in einem Volumen von 100 µl injiziert. Die Maus wurde nach der Punktion überwacht und die Temperaturregelung noch geraume Zeit mit einer Infrarot-Lampe unterstützt.

3.3.3.2 LFA-1-Antikörper

muM17 ist ein monoklonaler chimärer Maus/Ratte IgG-Antikörper, der wie Efalizumab gegen die CD11a-Untereinheit von LFA-1 gerichtet ist und als Ersatz für Efalizumab bei Studien im Mausmodell eingesetzt wurde [121]. Im Rahmen von pharmakodynamischen Untersuchungen von muM17 durch Wu et al. wurde ab einer Dosierung von 3 mg/kg Körpergewicht eine

maximale Herunterregulation der CD11a-Expression erreicht [122]. Für das vorliegende Versuchsmodell wurde daher eine etwas höhere Dosis von 5 mg/kg gewählt. Die Applikation des Antikörpers muM17 erfolgte an Tag 14 und Tag 18 s.c. in die Flankenregion. Der Antikörper wurde freundlicherweise von der Firma Genentech (San Francisco, USA) zur Verfügung gestellt.

3.3.4 Gewebebegewinnung

Für die Gewebebegewinnung erhielten die Tiere eine Sedierung mit Xylaxin 13 mg/kg KG und Ketamin 65 mg/kg KG i.p. und wurden dann durch zervikale Dislokation getötet.

Anschließend wurde das Tier in Rückenlage mit Klebestreifen auf einer Unterlage fixiert. Von abdominell ausgehend wurden Haut und Muskulatur bis zum Processus xiphoideus durchtrennt. Nach Anheben des Processus xiphoideus mit einer Pinzette wurde der Thorax durch eine V-förmige Durchtrennung der Rippen eröffnet. Die großen Gefäße wurden an deren Eintrittsstelle in das Herz abgetrennt und das Herz entnommen. Anschließend wurde das Herz mit physiologischer Kochsalzlösung gespült, um Blut und Koagel zu entfernen. Herzohren und Gefäßstümpfe wurden abgetrennt.

Zur Entnahme der Milz wurde der Darm nach rechts gelagert, um freie Sicht auf das Organ zu haben. Die Milz wurde vorsichtig mit einer Pinzette angehoben und der Gefäßhilus durchtrennt. Anschließend wurde das Organ in einer Petrischale durch Spülen mit physiologischer Kochsalzlösung von Blutresten befreit.

3.3.5 Durchflusszytometrie (Fluorescence activated cell sorting, FACS)

3.3.5.1 Prinzip der Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode zur quantitativen Charakterisierung von einzelnen Zellen, die dabei anhand ihrer Größe, Granularität und Expression bestimmter Moleküle auf der Zelloberfläche oder auch im Zellinneren differenziert werden können [76]. Dabei wird eine Zellsuspension über ein Glasröhrchen angesaugt und in einer Stahlkapillare beschleunigt. Durch die die Kapillare umgebende Trägerflüssigkeit wird eine laminare Strömung, ein sogenannter Hüllstrom, erzeugt. Beim Eintritt in die Messkammer werden die Zellen so stark beschleunigt, dass sie den Messbereich vereinzelt passieren. Die Zellen werden von einem blauen Argon-Laser mit einer Wellenlänge von 488 nm erfasst und angeregt, wodurch ein Streulicht in verschiedene Richtungen erzeugt wird. Durch das Vorwärtsstreulicht (Forwardscatter) kann die Größe der Zellen, durch das Seitwärtsstreulicht (Sidescatter) ihre Granularität erfasst werden. Eine weitere Differenzierung der Zellen erfolgt durch die Analyse von Oberflächenmarkern sowie intrazellulären Molekülen und basiert auf dem Prinzip der Immunphänotypisierung. Hierfür werden diese Moleküle durch mit Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelten Antikörper markiert. Durch den Laserstrahl werden die Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffes auf ein

höheres Energieniveau angehoben. Bei der Rückkehr zum ursprünglichen Energieniveau werden Photonen freigesetzt, wobei die Anzahl der Photonen mit der Anzahl an detektierten Molekülen korreliert. Die Photonen werden über Photomultiplier elektrisch verstärkt und durch Photodetektoren erfasst. Als Fluorochrome dienen die Farbstoffe FITC (Fluorescein-Isothiocyanat), PE (Phycoerythrin) und PerCP (Peridinin-Chlorophyll-Protein), welche sich durch ihre unterschiedlichen Emissions-Spektralbereiche unterscheiden.

3.3.5.2 Vorbereitung der Proben und Messung

Anhand der Durchflusszytometrie wurde eine Analyse des entzündlichen kardialen Infiltrates sowie der Lymphozytensubpopulationen in der Milz durchgeführt. Dazu wurden den Versuchstieren an Tag 21 nach Immunisierung Herz und Milz entnommen und untersucht.

Zur Aufbereitung des Herzens wurde dieses wie unter 3.3.4 entnommen und mit physiologischer Kochsalzlösung gespült, um es von jeglichen Blutrückständen zu säubern. Es wurde mit einem Skalpell in kleine Stücke geschnitten und in 0,1%-iger Kollagenaselösung 40 Minuten lang im Brutschrank bei 37 °C inkubiert, um die Kardiomyozyten aus ihrem Zellverbund zu lösen. Danach wurden die Herzstücke durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren weiter zerkleinert und durch ein 70 µm-Zellsieb in ein 50 ml-Röhrchen filtriert. Die dabei entstandene Suspension wurde mit PBS bis auf 10 ml aufgefüllt und für 5 min bei 12000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgekippt, das Zellpellet in 8 ml PBS + BSA 1% resuspendiert und erneut für 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert. Als nächsten Schritt wurden die Zellen in 500 µl DMEM-Medium mit 10% FCS aufgenommen und jeweils 50 µl davon in Eppendorf-Cups pipettiert.

Um aus der Milz eine Einzelzellsuspension zu generieren, wurde sie mit einem Skalpell klein geschnitten und mit dem Druckkolben einer 5 ml-Spritze in einer Petrischale mit DMEM-Medium (mit 10% FCS) weiter zerkleinert. Als nächster Schritt wurde das gelöste Gewebe über ein 70 µm-Zellsieb in ein 15 ml-Röhrchen gefiltert. Diese Suspension wurde mit DMEM-Medium bis auf 10 ml aufgefüllt und für 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert. Das verbliebene Zellpellet wurde in ACK-Lysis-Puffer (deionisiertes Wasser, NH₄Cl, KHCO₃, Na₂-EDTA, pH 7.2 - 7.4) gelöst und für 2 min bei Raumtemperatur inkubiert, um die verbleibenden Erythrozyten zu lysieren. Anschließend wurde erneut DMEM-Medium zugegeben und 5 min zentrifugiert. Dieser Schritt wurde noch einmal wiederholt, danach wurde das Zellpellet in Medium resuspendiert und die Lösung wurde auf Eppendorf Cups verteilt.

Die weitere Aufbereitung der Proben von Herz und Milz unterschied sich abhängig von der untersuchten Zellsubpopulation.

3.3.5.2.1 Charakterisierung von Leukozytensubpopulationen durch Oberflächenmarker

Zur Charakterisierung von Zellsubpopulationen anhand ihrer Oberflächenmoleküle wurden den wie oben beschrieben aufbereiteten Proben die jeweiligen Antikörper (siehe Tabelle 3) zugegeben und für 30 min bei Raumtemperatur in dunkler Umgebung inkubiert. Anschließend wurden den Proben PBS + BSA 1% zugegeben und sie wurden für 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgekippt, das Zellpellet in 500 µl PBS gelöst und in ein FACS-Röhrchen überführt.

Tabelle 3: Übersicht über Oberflächenmolekül-Antikörper, alle Angaben in µl

	Iso	CD 45	CD11b	CD11b/Gr-1	CD133
Iso PE	10				
Iso FITC	10				
Iso PerCP	10				
CD 4 FITC					
CD 11b FITC			10	10	
CD 45 PerCP		10	10	10	10
Prominin-1 FITC					10
CD 25 PerCP					
Gr-1 PE				10	

3.3.5.2.2 Bestimmung von T-regulatorischen Zellen

Zum Nachweis der T-regulatorischen Zellen wurde ein spezielles Kit der Firma BD Pharmingen verwendet. Die T-regulatorischen Zellen sind durch die Oberflächenmarker CD4 und CD25 und den intrazellulären Transkriptionsfaktor FoxP3 charakterisiert. Die wie unter 3.3.4.2 aufbereiteten Proben wurden zunächst mit den anti-CD4- und anti-CD25-Antikörpern für 30 min bei Raumtemperatur in dunkler Umgebung inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS + BSA 1% gewaschen und für 30 min mit 5%-iger FoxP3-Fixation-Puffer zur Fixierung der Lymphozyten bei 4°C dunkel gestellt. Dann wurden sie erneut mit PBS gewaschen. Um den intrazellulär gelegenen Transkriptionsfaktor FoxP3 nachzuweisen, wurde das Zellpellet in dem auf 37°C erwärmten Permeabilization Puffer gelöst und für 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert. Anschließend wurden die Proben mit dem Permeabilization Puffer für 10 min im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Nach einem Waschschrift mit PBS + BSA 1%, wurden die Proben nach Zugabe des FoxP3-Antikörpers für 20 min bei Raumtemperatur dunkel gestellt. Es

folgte ein letzter Waschschrift mit PBS + BSA 1%, danach wurde das Zellpellet in PBS resuspendiert und zur Messung in ein FACS-Röhrchen überführt.

3.3.5.2.3 Bestimmung der Th1-, Th2- und Th17-Zellen

Auch hierzu wurde ein spezielles Kit der Firma BD Pharmingen verwendet. Den wie unter 3.3.5.2 beschrieben vorbereiteten Proben wurde 140 μ l DMEM-Medium zugegeben und sie wurden für 4 Stunden mit Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) und Ionomycin im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Nach 2 Stunden wurde Monensin zugegeben. PMA und Ionomycin führen zu einer Zellaktivierung und dadurch zur Produktion von Zytokinen [123]. Monensin hingegen verhindert die Sekretion von Proteinen und führt dadurch zu einer Akkumulation von Zytokinen in der Zelle, wodurch das Fluoreszenzsignal der an die Zytokine bindenden Antikörper verstärkt wird [124]. Nach der Inkubation wurden die Proben für 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert und das Zellpellet wurde in 50 μ l PBS + BSA 1% aufgenommen. Als nächstes wurden die Zellen mit dem anti-CD4-Antikörper für 30 min bei Raumtemperatur und in dunkler Umgebung inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erneut mit PBS + BSA 1% gewaschen. Um die Lymphozyten zu fixieren und die Zellmembran zu permeabilisieren, wurden die Zellen mit der Fixation/Permeabilization-Solution von BD Pharmingen für 20 min bei 4 °C und in dunkler Umgebung inkubiert. Nach einem Waschschrift mit BD Perm/Wash-Puffer wurde das Zellpellet in 50 μ l BD Perm/Wash Puffer gelöst und mit den Zytokinantikörper (siehe Tabelle 4) für 30 min bei 4 °C inkubiert. Nach einem letzten Waschschrift mit BD Perm/Wash-Puffer wurden die Zellpellets in PBS gelöst und zur Messung in FACS-Röhrchen überführt.

Tabelle 4: Übersicht über Intrazellulär-Antikörper, alle Angaben in μ l

	Iso	FoxP3	INF- γ	IL-4	IL-17A
Iso PE	10				
Iso FITC	10				
Iso PerCP	10				
CD4 FITC		10	10	10	10
CD25 PerCP		10			
FoxP3 PE		5			
IFN- γ PE			1		
IL-4 PE				1	
IL-17A PE					1

Die Analyse der fluoreszenzmarkierten Zellen erfolgte mit einer 3-Farben-Durchflusszytometrie, wobei bei jeder Messung eine repräsentative Anzahl von 20 000 Zellen untersucht wurde. Um unspezifische Antikörperbindungen von der Analyse auszuschließen,

wurden Isotypen für die verschiedenen Fluorochrome (PE-, PerCP-, FITC-gelabelt) eingesetzt. Alle Messungen erfolgten mit dem Durchflusszytometer „Coulter Epics XL“ der Firma Beckmann und Coulter. Zur Analyse der Daten wurde das Programm Expo 32 verwendet.

3.3.6 Histologische Aufbereitung

Die histologische Aufbereitung der Herzen und die Auswertung der Schnitte wurden in Kooperation mit dem Institut für Tierpathologie der Ludwig-Maximilians-Universität München (PD Dr. med. vet. Nadja Herbach und Dr. med. vet. Andreas Blutke) sowie dem Zentrum für Molekulare Kardiologie der Universität Zürich (Prof. Dr. med. Gabriela Kania) durchgeführt.

3.3.6.1 Fallstromperfusion

Zur Durchführung der Fallstromperfusion wurde ein spezielles System bestehend aus zwei Perfusionsbehältern, die jeweils mit PBS und einer 4%-igen Formalinlösung gefüllt und über ein Schlauchsystem und einen Dreiwegehahn miteinander verbunden waren, verwendet. Nach sachgerechter Tötung des Tieres durch Genickbruch wurde der Thorax eröffnet, das Herz frei präpariert und die Vena cava inferior unterhalb ihrer Mündung im rechten Vorhof mit einer Schere unterlegt. Mit einer am Schlauchsystem befestigten 20G Kanüle wurde der rechte Ventrikel punktiert und das Herz wurde darüber zunächst mit 2 ml einer 2%-igen Lidocainlösung gespült, um standardisiert einen diastolischen Herzstillstand herbeizuführen. Gleichzeitig wurde die Vena cava inferior durchtrennt. Anschließend wurde das Herz mit PBS gespült, bis es blutleer war und danach für 5 min mit der 4%-igen Formalinlösung perfusionsfixiert. Das Organ wurde durch Abtrennung der großen Gefäße entnommen und für 24 Stunden erneut in 4%-igem Formalin fixiert. Danach wurde das Herz von Geweberesten gesäubert und das Herzgewicht mittels einer Feinwaage bestimmt. Anschließend wurde das Organ in 70%-igen Ethanol überführt.

3.3.6.2 Paraffineinbettung und Schnittherstellung

Zunächst wurden die Proben mittels aufsteigender Alkoholreihe in einem Einbettungsautomaten entwässert. Anschließend wurden die Herzen in ca. 1 mm dicke Scheiben geschnitten und in Paraffin eingebettet. Mit Hilfe eines Mikrotoms wurden nun ca. 3 bis 4 µm dicke Schnitte des Präparates angefertigt und auf einen Objektträger aufgezogen. Um die Schnitte zu trocknen, wurden sie für mindestens 24 Stunden bei 37 °C in einem Wärmeschrank gelagert. Danach wurden die Objektträger zur Entfernung des Paraffins für 20 min in Xylol gelegt und in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert, bevor sie gefärbt werden konnten.

3.3.6.3 Färbungen

3.3.6.3.1 Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung

Die Herzschnitte wurden zunächst für 5 min mit Hämalaun gefärbt, anschließend unter fließendem Wasser für weitere 5 min gespült und mit 5%-igem HCl-Alkohol differenziert. Nach einer erneuten Wässerung wurden die Objektträger für 2 min mit Eosin behandelt. Im Anschluss daran wurden sie mit Aqua dest., einer aufsteigenden Alkoholreihe und Xylol gespült. Zuletzt wurden die Herzschnitte mit Histokitt und Deckgläschen eingedeckt. Hämalaun färbt alle basophilen Strukturen wie die Zellkerne mit DNA blau. Eosin färbt alle eosinophilen Strukturen rot, so dass vor allem die Zellplasmaproteine erfasst werden.

3.3.6.3.2 Masson -Trichrom-Färbung

Für diese Färbung wurden die Schnitte für 5 min in Weigerts Eisenhämatoxylin gelegt, danach für weitere 5 min gewässert und mit 5%-igem HCl-Alkohol differenziert. Es folgte eine erneute Wässerung, bevor die Objektträger für 15 min mit roter Farbe behandelt wurden. Anschließend wurden sie zunächst mit Aqua dest., dann mit 0,5%-iger Essigsäure gespült und für 3 min in Phosphorwolframsäure-Orange G getaucht. Nach einer erneuten Spülung mit Aqua dest. und Essigsäure wurden die Schnitte für 30 Sekunden mit Anilinblau behandelt. Wiederum erfolgte eine Spülung mit Aqua dest. und Essigsäure, bevor die Herzschnitte eine aufsteigende Alkoholreihe durchliefen. Als letzten Schritt wurden sie analog zur HE-Färbung eingedeckt. Bei der Masson-Trichrom-Färbung handelt es sich um eine differenzierte Bindegewebsdarstellung, wobei sich Kollagen durch Blautöne hervorhebt.

3.3.6.4 EAM-Score

Der EAM-Score ist ein semiquantitatives Analyseverfahren, das anhand der Ausprägung des entzündlichen Infiltrates den Schweregrad der EAM erfasst. Dazu wurden die Herzen wie unter 3.3.5.1 beschrieben an Tag 21 nach Immunisierung aufbereitet und HE-Schnitte angefertigt. Die Auswertung der verblindeten Proben wurde von unseren Kooperationspartnern des Instituts für Molekulare Kardiologie der Universität Zürich durchgeführt. Je nach Ausprägung des inflammatorischen Infiltrates erfolgte die Einteilung in Grad 0 bis 4. Grad 0 bedeutet, dass kein entzündliches Infiltrat zu sehen ist. Grad 1 beschreibt das Vorkommen von kleinen Bereichen mit Entzündungszellen zwischen den Kardiomyozyten. Bei Grad 2 liegen größere Herde mit mindestens 100 Entzündungszellen zwischen den Kardiomyozyten vor. Bei Grad 3 bedeutet, dass mehr als 10% des Herzens von Entzündungszellen infiltriert ist, bei Grad 4 mehr als 30% [89].

3.3.6.5 Bestimmung der kardialen Fibrose

Um die Ausprägung der kardialen Fibrose zu untersuchen, wurden die Herzen an Tag 49 wie unter 3.3.6.1 beschrieben aufbereitet und Masson-Trichrom-Schnitte angefertigt. Anhand der Morphometrie und eines computerassistierten, automatisierten Visiopharm-Stereologiesystems wurde der relative Volumenanteil der Fibrose am Myokard berechnet.

In der 1,25fachen Vergrößerung wurden alle 4 bis 6 Herzquerschnitte eines Präparates mit einem Photomikroskop und des Programmes eingegrenzt und anhand eines automatischen und randomisierten Verfahrens 35% der erfassten Fläche zur Analyse ausgewählt. Über die ausgewählten Bildausschnitte wurden nun in 20facher Vergrößerung zwei Punkteraster gelegt. Das grobe Raster umfasste 25 Punkte pro Bildausschnitt und diente zur Bestimmung des Myokardanteils am gesamten Herzgewebe. Durch das feine Raster, welches 225 Punkte pro Bildausschnitt enthielt, wurde der Anteil des fibrotischen Gewebes am Myokard erfasst (siehe Abb. 6). Nach der Auswertung aller vom System ausgewählter Bildausschnitte ergab sich somit eine Gesamtanzahl von Myokard- (ΣP (Myokard)) und Fibrosepunkten (ΣP (Fibrose)) pro Herz.

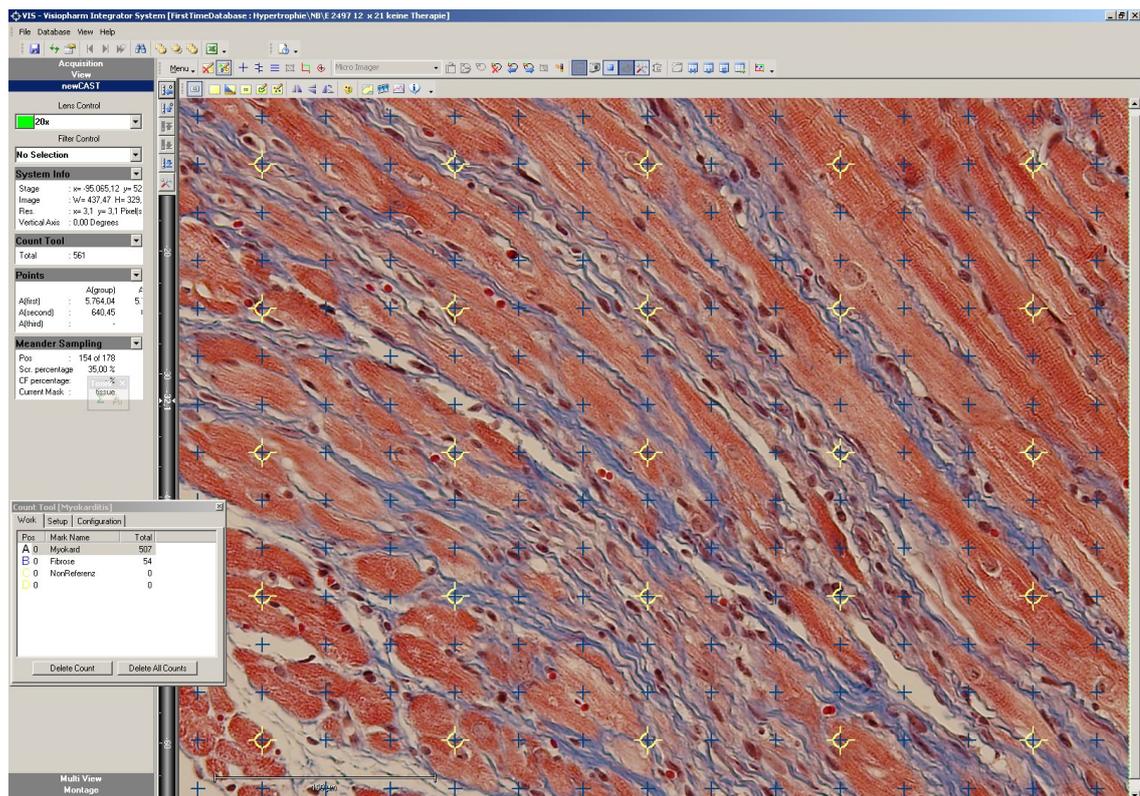


Abbildung 5: Bestimmung der kardialen Fibrosierung

Bestimmung der kardialen Fibrosierung an Tag 49 anhand der Morphometrie. Mit den gelb umrandeten Kreuzen wird der Anteil des Myokards am Herzgewebe erfasst, mit den blauen Kreuzen der Anteil der kardialen Fibrose.

Da sich das vorgegebene Punkteraster für das Myokard und die Fibrose in der Punkteanzahl unterschied, musste bei der Berechnung des Fibrosevolumengehalts der Faktor 225/25 berücksichtigt werden.

$$V_v \left(\frac{\text{Fibrose}}{\text{Myokard}} \right) = \frac{\Sigma P(\text{Fibrose})}{\Sigma P(\text{Myokard}) \times \frac{225}{25}}$$

Zur Berechnung des Fibrosevolumens wurde zunächst mithilfe des vorher bestimmten Herzgewichts $m(\text{Herz})$ der Maus und dem spezifischen Herzgewicht ($1,055 \text{ mg/mm}^3$) das Herzvolumen $V(\text{Herz})$ berechnet.

$$V(\text{Herz})[\text{mm}^3] = \frac{m(\text{Herz})[\text{mg}]}{\text{spezif. Herzgewicht}[\text{mg/mm}^3]}$$

Das Fibrosevolumen wurde dann anhand folgender Gleichung berechnet:

$$V(\text{Fibrose, Myokard})[\text{mm}^3] = V(\text{Herz})[\text{mm}^3] \times V_v \left(\frac{\text{Fibrose}}{\text{Myokard}} \right)$$

3.3.7 Quantitative Real-time RT-PCR

3.3.7.1 Prinzip der quantitativen Real-time RT-PCR

Die Real-time RT-PCR ist eine Methode zur quantitativen Bestimmung der mRNA-Expression bestimmter Gene. Sie beruht auf dem Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion, mit Hilfe derer sich eine DNA-Sequenz exponentiell vervielfältigen lässt. Zunächst muss jedoch die mRNA in cDNA umgeschrieben werden. Für den Ablauf der PCR sind die das Zielgen flankierende Primerpaar, die Taq-Polymerase, die vier Desoxyribonucleosidtriphosphate sowie ein geeigneter Puffer notwendig. Der Amplifikationszyklus setzt sich aus drei Phasen zusammen. In der Denaturierungsphase wird der DNA-Strang durch eine Erhitzung auf $95 \text{ }^\circ\text{C}$ in zwei Einzelstränge getrennt. Im zweiten Schritt (Primerhybridisierung) wird die Probe auf die spezifische Annealing-Temperatur abgesenkt, so dass sich die Primer sequenzspezifisch an die DNA-Matrize anlagern können. Während der nun folgenden Elongationsphase wird die Probe auf das Temperaturoptimum der Taq-Polymerase von $72 \text{ }^\circ\text{C}$ erhitzt, welche die Primersequenzen vom 5'- in Richtung 3'-Ende verlängert. Nach dem ersten Amplifikationszyklus resultieren somit zwei reverse komplementär ergänzte Stränge [125]. Die Quantifizierung erfolgt durch Fluoreszenzsignale, die durch den mit der DNA interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green erzeugt werden. Der Farbstoff fluoresziert im gebundenen Zustand stärker als im ungebundenen Zustand. Die Zunahme des Fluoreszenzsignals entspricht somit einer Zunahme an Target-DNA. Dadurch kann auf die RNA-Ausgangsmenge eines Proteins in der untersuchten Probe rückgeschlossen werden.

3.3.7.2 RNA-Isolierung mit Trizol und DNase-Verdau

Herz und Milz wurden wie unter 3.3.4 beschrieben an Tag 21 nach der Immunisierung entnommen, jeweils in eine auf Eis liegende Petrischale mit 500 µl TRI-Reagent gegeben und sofort mit Ultraschall zerkleinert. Nach einer Inkubationszeit von 5 min wurde Chloroform (200 µl/ml Trizol) dazu pipettiert und die Probe wurde für 15 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand, welcher die RNA enthielt, wurde in ein neues Eppendorf Cup überführt. Zur Ausfällung der RNA wurde 500 µl Isopropanol pro 1 ml Probenvolumen hinzugefügt, die Probe wurde für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend für weitere 10 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Nach einem Waschschriff mit 75%-igem Ethanol wurde das gewonnene Zellpellet in RNAase freiem Wasser gelöst. Um eine Kontamination mit genomischer DNA zu verhindern, wurden die Proben mit DNase I Amplificatin Grade Kit der Firma Invitrogen behandelt. Zur Konzentrationsbestimmung der isolierten RNA wurde eine Messung mit dem NanoDrop-Spektrophotometer durchgeführt, wodurch gleichzeitig die Reinheit der RNA bestimmt werden konnte. Anschließend wurden die Proben bei -80 °C aufbewahrt.

3.3.7.3 cDNA-Synthese

Zur Synthese der cDNA wurde jeweils 2 µl RNA (2 µg/µl) und der Omniscript Reverse Transcriptase Kit von Quiagen, verwendet. Die cDNA wurde in einem Gesamtvolumen von 20 µl in 60 min bei 37 °C nach dem Protokoll des Kits synthetisiert. Zum Beenden der Reaktion und zur Inaktivierung der verbliebenen Reversen Transkriptase wurde die Probe für 5 min bei 93 °C inkubiert. Die gewonnene cDNA wurde bei -20 °C konserviert.

3.3.7.4 Durchführung der quantitative Real-time RT-PCR

Für die PCR wurden je Probe 2 µl der cDNA in einem Gesamtvolumen von 20 µl verwendet. Dieses setzte sich aus 10 µl IQ SYBR Green Supermix, jeweils 2,5 µl der beiden Primer und 3 µl sterilem Wasser zusammen. Der iQ SYBR Green Supermix enthält die iTaq-DNA-Polymerase, dNTPs, 6 mM MgCl₂ und den Fluoreszenzfarbstoff SYBER Green. Die PCR wurde mit Hilfe eines Thermocyclers als Doppelbestimmung durchgeführt. Der Amplifikationszyklus setzt sich jeweils aus der Denaturierungs- (95 °C für 30 s), Annealing- (Primer-spezifische Annealingtemperatur für 30s) und Elongationsphase (72 °C für 10 s) zusammen. Insgesamt wurden 40 Zyklen durchgeführt. Im Folgenden sind die Primer mit ihren spezifischen Annealingtemperaturen aufgeführt. Als Referenzgen diente das Gen der 18S rRNA.

Tabelle 5: Übersicht über verwendete Primer

Target-gen	Sequenz - sense	Sequenz - antisense	Annealing-temperatur
ss18	5'-CTC GTT CGT TAT CGG AAT TAA C-3'	5'-GGA CAG GAT TGA CAG ATT GAT AG-3'	56,8 °C
IFN-γ	5'-AAT GCT TGG CGC TGG ACC TGT-3'	5'-GGC CAT CAG CAA CAA CAT AAG CGT-3'	62,4 °C
IL-4	5'-GAA GCC CTA CAG ACG AGC TCA-3'	5'-ACA GGA GAA GGG ACG CCA T-3'	56,0 °C
IL-6	5'-GCC TTC TTG GGA CTG ATG-3'	5'-GAC AGG TCT GTT GGG AGT GG-3'	58,1 °C
IL-10	5'-TCA TGT ATG CTT CTA TGC AGT TGA TG-3'	5'-AGT GGA GCA GGT GAA GAG TGA TT-3'	59,9 °C
IL-12	5'-CTG GAG AAA GAC GTT TAT GTT G-3'	5'-GTC TGA GGT CCA GGT GAT G-3'	56,8 °C
IL-17A	5'-TCC CTC CGC ATT GAC ACA-3'	5'-ACC GCA ATG AAG ACC CTG AT-3'	59,9 °C
TGF-β	5'-GGC GTA TCA GTG GGG GTC AG-3'	5'-GAC CGC AAC AAC GCC ATC TA-3'	62,4 °C
TNF-α	5'-GAC GTG GAA CTG GCA GAA GA-3'	5'-ACT GAT GAG AGG GAG GCC AT-3'	58,1 °C

Im Rahmen des Amplifikationszyklus können neben dem gewünschten Transkript auch Nebenprodukte entstehen. Zur Unterscheidung dieser unspezifischen PCR-Produkte wurde nach jedem PCR-Lauf eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt.

3.3.7.5 Auswertung mittels delta-delta-CT-Methode

Die abschließende Auswertung der PCR-Ergebnisse erfolgte anhand einer relativen Quantifizierung, bei der die relative Expression des Zielgens auf die relative Expression eines Referenzgens bezogen wird. Als Referenzgen fungierte ein sogenanntes Housekeeping-Gen, das unabhängig von äußeren Einflüssen konstant exprimiert wird. In der vorliegenden Arbeit wurde dazu das Referenzgen 18S rRNA verwendet. Die Berechnung erfolgte über die $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode nach Livak [126]. Hierfür ist die Bestimmung des Threshold-Cycles oder CT-Wertes notwendig. Der CT-Wert ist definiert als der Zyklus, bei welchem das Fluoreszenzsignal die Hintergrundfluoreszenz signifikant überschreitet. Zunächst wird die Expression des Zielgens auf das konstant exprimierte Referenzgen normiert.

$$\Delta CT = CT(\text{Zielgen}) - CT(\text{Referenzgen})$$

Anschließend wird aus den ΔCT -Werten der behandelten und unbehandelten Kontrollgruppe der $\Delta\Delta CT$ -Wert gebildet. Wird dieser Wert nun in die Formel $2^{-\Delta\Delta CT}$ gesetzt, erhält man den relativen Expressionsunterschied des Zielgens in der behandelten verglichen mit der unbehandelten Gruppe.

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT(\text{behandelt}) - \Delta CT(\text{unbehandelt})$$

$$\text{Relative Expression} = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

3.3.8 Echokardiographie

3.3.8.1 Prinzip der Echokardiographie

Die Echokardiographie ist ein nicht invasives bildgebendes Verfahren, das einen sehr wichtigen Stellenwert in der Diagnostik und im Therapie-Monitoring von kardialen Erkrankungen hat. Durch die Untersuchung kann sowohl die Morphologie als auch die Funktion des Herzens beurteilt werden. Dazu werden Schallwellen mit einer Frequenz von 20 kHz bis 1 GHz, die für das menschliche Gehör nicht wahrnehmbar sind, eingesetzt. Die Ultraschallwellen werden durch piezoelektrische Kristalle im Schallkopf erzeugt und in das zu untersuchende Gewebe gesendet. Entscheidend für die Schallausbreitung im Organismus ist die Impedanz, der Widerstand eines Gewebes. Abhängig von der Zusammensetzung eines Gewebes und den damit einhergehenden unterschiedlichen Impedanzen werden die Schallwellen an den Grenzflächen unterschiedlich stark reflektiert. Durch ein wasserhaltiges Gel wird der hohe Impedanzunterschied zwischen Luft und Hautoberfläche überwunden. Die vom Gewebe reflektierten Schallwellen werden vom Schallkopf empfangen und an das Ultraschallgerät übermittelt. Die Intensität des reflektierten Signals wird auf dem Monitor in Form von Graustufen dargestellt. Je heller eine Struktur ist, desto stärker wird der Schall von ihr reflektiert. Durch die Laufzeit der ausgesandten Schallwelle wird die Tiefe der reflektierenden Struktur ermittelt.

3.3.8.2 Vorbereitung und Durchführung der Untersuchung

Um funktionelle Unterschiede zwischen Therapie- und Kontrollgruppe zu erheben, wurde bei den Versuchstieren eine Echokardiographie an Tag 49 durchgeführt. Außerdem wurde bei jedem Tier eine Baseline-Messung an Tag 0 vor der ersten Immunisierung durchgeführt, um eine Aussage über den Langzeitverlauf treffen zu können.

Alle echokardiographischen Untersuchungen wurden mit dem Kleintierechokardiographiesystem Vevo 2100 von Visual Sonics und einer 40 Hz-Sonde durchgeführt. Sie erfolgten unter Inhalationsnarkose mit Isofluran. Nach der Narkoseeinleitung

mit Isofluran 3% in einer speziellen Box wurde die Maus in Rückenlage mit Klebestreifen auf einer Wärmeplatte fixiert. Über eine Verbindung mit einer Analsonde wurde eine konstante Körpertemperatur von 36 - 37 °C gewährleistet. Auch die Herz- und Atemfrequenz wurden über spezielle Elektroden auf der Wärmeplatte und Elektrodengel überwacht. Die Augen wurden mittels Bepanthen-Augensalbe vor dem Austrocknen geschützt. Während des gesamten Untersuchungszeitraums wurde die Anästhesie mit Isofluran 1,5% bis 2% über eine Inhalationsmaske aufrechterhalten. Vor Untersuchungsbeginn wurde der Brustbereich mit Veet-Haarentfernungscreme enthaart. Anschließend wurde angewärmtes Ultraschallgel großzügig auf den enthaarten Bereich aufgetragen und die parasternale lange Achse eingestellt. Indem der Schallkopf aus dem M-Mode dieses Schnittes um 90° gedreht wurde, wurde ein Schnitt durch beide Papillarmuskeln erzeugt und somit eine standardisierte Positionierung des Schallkopfes zur Generierung des M-Modus in der parasternalen kurzen Achse gewährleistet. Anhand dieses Schnittes wurden nun folgende Parameter zur Evaluierung der linksventrikulären Funktion untersucht und berechnet: Enddiastolisches Volumen (EDV), Endsystolisches Volumen (ESV), Linksventrikuläre Ejektionsfraktion (EF), Fractional Shortening (FS), Stroke Volume Index (SVI). Pro Versuchstier wurden die Parameter jeweils an drei aufeinanderfolgenden Herzzyklen gemessen und der Mittelwert gebildet.

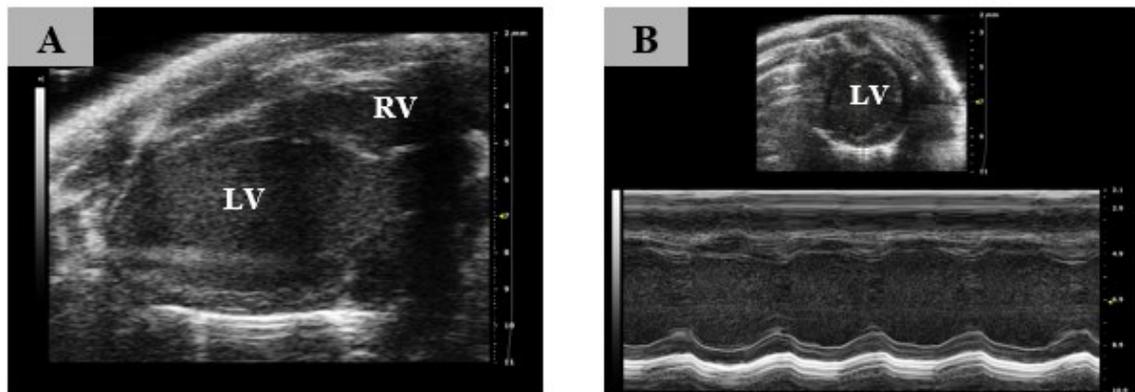


Abbildung 6: Erfassung der kardialen Funktion mittels Echokardiographie

Die kardiale Funktion der Versuchstiere wurde mittels Kleintierechokardiographiesystem an Tag 49 erfasst. Darstellung repräsentativer echokardiographischer Herzschnitte. Bild A zeigt einen Herzschnitt durch die parasternale lange Achse. Bild B zeigt einen Herzschnitt durch die parasternale kurze Achse mit M-Mode zur Erfassung der linksventrikulären Funktion. LV: linker Ventrikel, RV: rechter Ventrikel.

3.3.9 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse wurden als Mittelwert mit dem Standardfehler des Mittelwertes ($MW \pm SEM$) angegeben. Mit dem Anderson-Darling-Test wurde untersucht, ob bei den erhobenen Daten eine Normalverteilung vorliegt. Die statistische Auswertung erfolgte für normalverteilte Daten mit dem Student's T-test und für nicht normalverteilte Daten mit dem Mann-Whitney-U-Test. Als signifikant wurde ein p-Wert von $< 0,05$ angesehen.

4.1.2 Evaluation des entzündlichen kardialen Infiltrats mittels Durchflusszytometrie

Nachdem sich in der Histologie kein Unterschied in der Ausprägung der kardialen Inflammation nach der Blockade von LFA-1 zeigte, wurde die Zusammensetzung des entzündlichen Infiltrates nach Therapie mit dem LFA-1-Antikörper mittels Durchflusszytometrie genauer untersucht. Die FACS-Analyse wurde ebenso an Tag 21 durchgeführt.

4.1.2.1 CD45+ Zellen

Auch im FACS zeigt sich nach Gabe des LFA-1-Antikörper im Vergleich zu den unbehandelten Kontrolltieren kein Unterschied in der Menge der in das Myokard eingewanderten CD45+ Zellen ($10,0 \pm 11,4\%$ vs. $10,0 \pm 8,3\%$, $p = 0,579$, Abb. 8). Dies deutet erneut darauf hin, dass die Infiltration von Leukozyten in das entzündete Myokard unabhängig von der LFA-1/ICAM-Interaktion erfolgen kann.

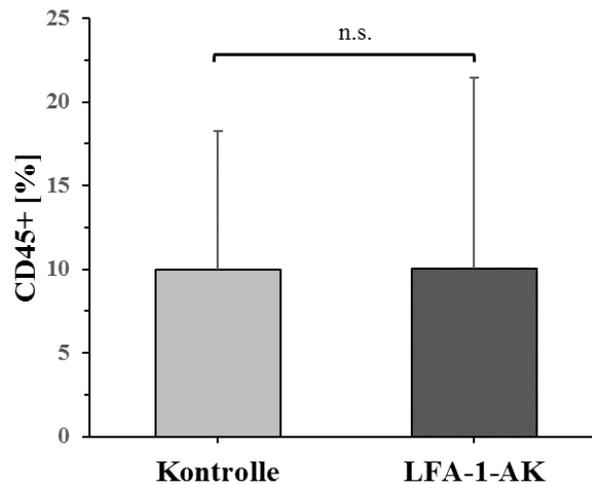


Abbildung 8: Prozentualer Anteil der CD45+ Zellen im Herzen nach LFA-1-Antikörpertherapie

Vergleich des prozentualen Anteils von CD45+ Zellen im Herzen an Tag 21 bei immunisierten/unbehandelten Kontrolltieren (Kontrolle) verglichen mit immunisierten/ LFA-1-AK behandelten Tieren (LFA-1-AK). Bestimmung anhand Durchflusszytometrie. Kontrolle: $n = 15$, LFA-1-AK: $n = 19$. $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant gewertet. n.s. = nicht signifikant.

4.1.2.2 CD45+/CD11b+ Zellen und CD45+/CD11b+/Gr-1+ Zellen

Die Zellpopulation der CD45+/CD11b+ Zellen setzt sich aus Monozyten, Makrophagen und Granulozyten zusammen [92]. Die Infiltration dieser Zellpopulation wurde durch die LFA-1-Blockade nicht beeinflusst. Der Anteil der in das Herz eingewanderten CD45+/CD11b+ Zellen war nach Gabe des LFA-1-Antikörpers im Vergleich zu den unbehandelten Mäusen nicht reduziert ($5,14 \pm 5,16\%$ vs. $4,27 \pm 3,31\%$, $p = 0,917$, Abb. 9A).

Mit Hilfe des Oberflächenmarker Gr-1 wurden aus dieser Gruppe die neutrophilen Granulozyten (CD45+/CD11b+/Gr-1+) isoliert betrachtet. Auch der Anteil dieser Zellpopulation blieb bei den behandelten Tieren im Vergleich zu den unbehandelten Kontrolltieren unverändert ($3,18 \pm 3,55$ % vs. $2,11 \pm 1,87$ %, $p = 0,332$, Abb. 9B).

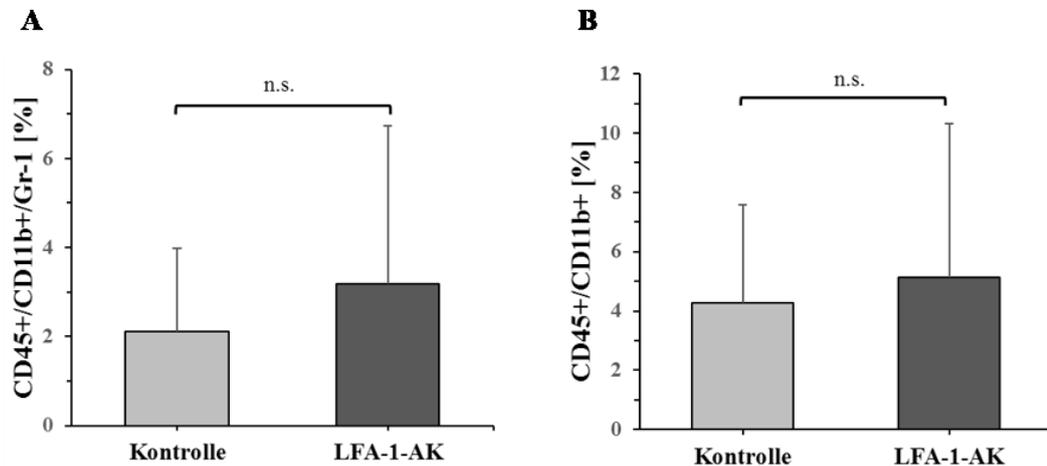


Abbildung 9: Prozentualer Anteil der CD45+/CD11b+ und CD45+/CD11b+/Gr-1+ Zellen im Herzen nach LFA-1-Antikörpertherapie

Vergleich des prozentualen Anteils von CD45+/CD11b+ Zellen (A) und CD45+/CD11b+/Gr-1+ Zellen (B) im Herzen an Tag 21 bei immunisierten/ unbehandelten Kontrolltieren (Kontrolle) verglichen mit immunisierten/ LFA-1-AK behandelten Tieren (LFA-1-AK). Bestimmung anhand Durchflusszytometrie. Kontrolle: $n = 15$, LFA-1-AK: $n = 19$. $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant gewertet. n.s. = nicht signifikant.

4.1.2.3 CD45+/Prominin-1+ Zellen

Ebenso konnte kein Unterschied beim Anteil der CD45+/Prominin-1+ Progenitorzellen zwischen behandelten und unbehandelten Tieren festgestellt werden ($1,46 \pm 1,72$ % vs. $1,34 \pm 1,05$ %, $p = 0,781$, Abb. 10). Da diese aus dem Knochenmark stammenden Progenitorzellen maßgeblich am kardialen Remodeling beteiligt sind [90], lässt das Ergebnis vermuten, dass durch die Blockade von LFA-1 die Entwicklung einer iDCM im Rahmen der EAM nicht verhindert werden kann.

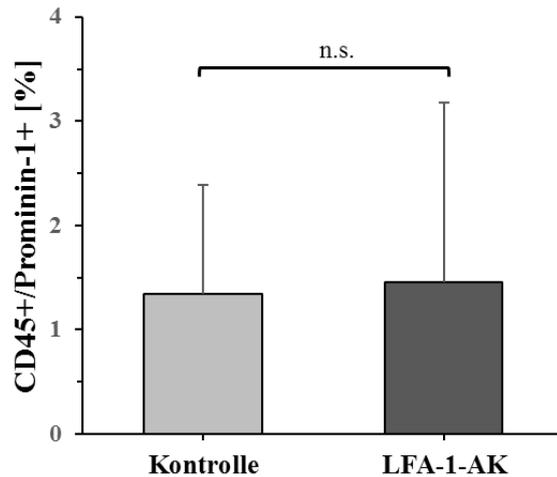


Abbildung 10: Prozentualer Anteil der CD45+/Prominin-1+ Zellen im Herzen nach LFA-1-Antikörpertherapie

Vergleich des prozentualen Anteils von CD45+/Prominin-1+ Zellen im Herzen an Tag 21 bei immunisierten/ unbehandelten Kontrolltieren (Kontrolle) verglichen mit immunisierten/ LFA-1-AK behandelten Tieren (LFA-1-AK) Bestimmung anhand Durchflusszytometrie. Kontrolle: n = 15, LFA-1-AK: n = 19. $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant gewertet. n.s. = nicht signifikant.

4.1.2.4 CD4+ Zellen

Die Blockade von LFA-1 führte im Vergleich zu den unbehandelten Kontrolltieren nicht zu einer Verringerung der in das Myokard eingewanderten CD4+ T-Helferzellen ($11,4 \pm 5,0$ % vs. $11,2 \pm 6,7$ %, $p = 0,51$, Abb. 11). Dieses Ergebnis legt nahe, dass auch die Migration der CD4+ T-Helferzellen in das entzündete Myokard nicht von LFA-1 abhängig ist.

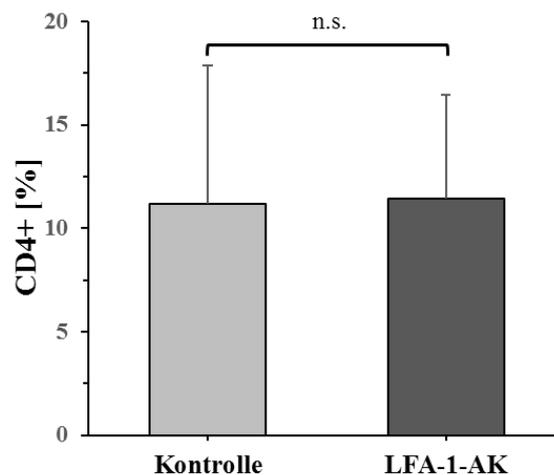


Abbildung 11: Prozentualer Anteil der CD4+ Zellen im Herzen nach LFA-1-Antikörpertherapie

Darstellung des prozentualen Anteils von CD4+ Zellen im Herzen an Tag 21 bei immunisierten/ unbehandelten Kontrolltieren (Kontrolle) verglichen mit immunisierten/LFA-1-AK behandelten Tieren (LFA-1-AK) Bestimmung anhand Durchflusszytometrie. Kontrolle: n = 15, LFA-1-AK: n = 19. $p < 0,05$ wurden als statistisch signifikant gewertet. n.s. = nicht signifikant.

4.1.2.5 T-regulatorische Zellen

Die T-regulatorischen Zellen sind eine Subpopulation der CD4⁺ T-Helferzellen, die eine zentrale Rolle in der Aufrechterhaltung des immunologischen Gleichgewichts und somit in der Verhinderung von Autoimmunerkrankungen spielen [127, 128]. Zusätzlich zu den Oberflächenmarkern CD4 und CD25 (Interleukin-2-Rezeptor) exprimieren sie den Transkriptionsfaktor FoxP3 [127]. Nach Gabe des LFA-1-Antikörpers war die Menge der CD4⁺/CD25⁺/FoxP3⁺ Zellen im Herzen im Vergleich zu den unbehandelten Kontrolltieren unverändert ($0,56 \pm 0,45$ % vs. $0,59 \pm 0,50$ %, $p = 0,781$, Abb. 12).

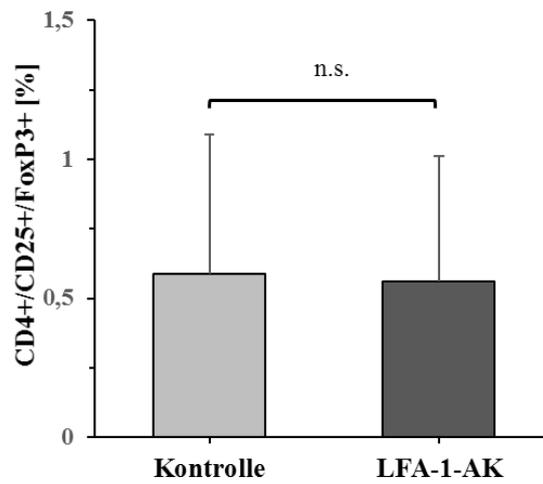


Abbildung 12: Prozentualer Anteil der T-regulatorischen Zellen im Herzen nach LFA-1-Antikörpertherapie

Darstellung des prozentualen Anteils von CD4⁺/CD25⁺/FoxP3⁺ Zellen im Herzen an Tag 21 bei immunisierten/ unbehandelten Kontrolltieren (Kontrolle) verglichen mit immunisierten/ LFA-1-AK behandelten Tieren (LFA-1-AK). Kontrolle: n = 15, LFA-1-AK: n = 19. $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant gewertet. n.s. = nicht signifikant.

4.1.2.6 Th1-/ Th2-/ Th17-Zellen

Wie bereits beschrieben gilt die EAM als CD4⁺ Zell-vermittelte Erkrankung [81]. Dabei sind sowohl die Th1- als auch die Th2- und Th17- Zellen an der Pathogenese der Myokarditis und DCM beteiligt [88]. Diese CD4⁺ Subpopulationen unterscheiden durch die Produktion von für sie prototypischen Zytokinen: für die Th1-Zellen ist dies Interferon- γ (IFN- γ), für die Th2-Zellen Interleukin-4 (IL-4) und für die Th17-Zellen das Interleukin-17A (IL-17A) [129, 130]. Auch diese Zellpopulationen wurden mit Hilfe der FACS-Analyse und dem Nachweis von intrazellulären Markern untersucht.

Die Menge der in das Herz eingewanderten Th1-Zellen (CD4⁺/IFN- γ ⁺ Zellen) wurde durch die Gabe des LFA-1-Antikörpers im Vergleich zu den unbehandelten Kontrolltieren nicht verändert ($10,2 \pm 4,4$ % vs. $10,4 \pm 7,6$ %, $p = 0,349$, Abb. 13A). Auch die Th2-Zellen (CD4⁺/IL-4⁺

Zellen) wurden durch die Blockade von LFA-1 nicht beeinflusst ($11,0 \pm 5,9\%$ vs. $10,3 \pm 5,7\%$, $p = 0,677$, Abb. 13B), ebenso nicht die Th17-Zellen ($10,6 \pm 5,0\%$ vs. $11,1 \pm 6,9\%$, $p = 0,729$, Abb. 13C).

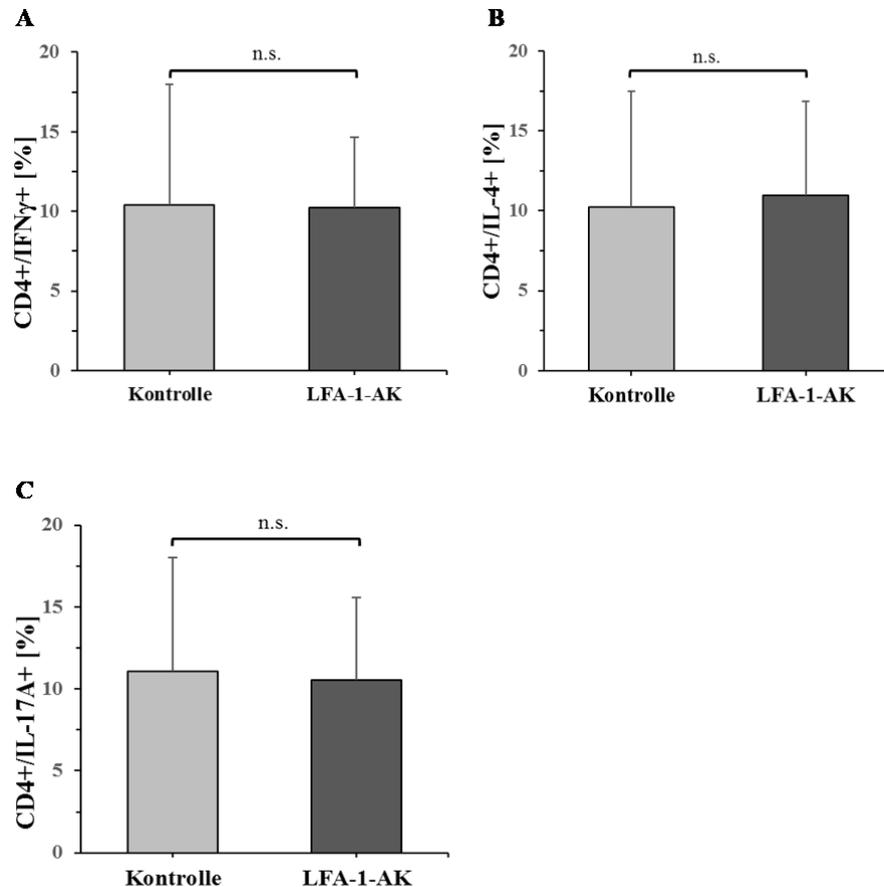


Abbildung 13: Prozentualer Anteil der Th-Zellpopulationen im Herzen nach LFA-1-Antikörpertherapie

Darstellung des prozentualen Anteils der Th-Zellpopulationen im Herzen an Tag 21 bei immunisierten/unbehandelten Kontrolltieren (Kontrolle) verglichen mit immunisierten/ LFA-1-AK behandelten Tieren (LFA-1-AK). Bestimmung anhand Durchflusszytometrie. Kontrolle: $n = 15$, LFA-1-AK: $n = 19$. $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant gewertet. n.s. = nicht signifikant.

4.1.3 Evaluation der CD4+ Subpopulationen in der Milz

Die Interaktion von LFA-1 und ICAM-1 spielt nicht nur bei der Zelladhäsion und -migration eine wichtige Rolle, sondern ist auch an der T-Zell-Aktivierung beteiligt [91]. Um zu evaluieren, wie sich die Blockade der LFA-1/ICAM-1-Interaktion bei der EAM auf die T-Zell-Aktivierung auswirkt, wurde die Milz als Ort der T-Zell-Vermehrung und Reifung an Tag 21 entnommen und bestimmte T-Zell-Subpopulationen mittels Durchflusszytometrie untersucht.

Die Menge der Th2-Zellen war nach Blockade von LFA-1 im Trend bei den behandelten Tieren im Vergleich zu den unbehandelten Tieren erhöht, signifikant war der Unterschied allerdings nicht ($17,3 \pm 9,1$ % vs. $12,8 \pm 5,6$ %, $p = 0,109$, Abb. 14B).

Auf die Th1-Zellen hatte die LFA-1-Antikörpertherapie keine Auswirkungen. Es ließ sich kein Unterschied zwischen mit LFA-1-Antikörper behandelten und unbehandelten Kontrolltieren feststellen ($16,1 \pm 8,2$ % vs. $12,6 \pm 5,7$ %, $p = 0,152$, Abb. 14A).

Ebenso verhielt es sich mit den Th17-Zellen. Auch hier zeigte sich zwischen mit LFA-1-Antikörper behandelten Tieren und unbehandelten Kontrolltieren kein Unterschied im prozentualen Anteil der Th17-Zellen ($11,0 \pm 4,4$ % vs. $9,2 \pm 3,7$ %, $p = 0,210$, Abb. 14C).

Die Anzahl der T-regulatorischen Zellen in der Milz war nach Gabe des LFA-1-Antikörpers ebenfalls unverändert ($1,93 \pm 0,55$ % vs. $1,59 \pm 0,78$ %, $p = 0,170$, Abb. 14D).

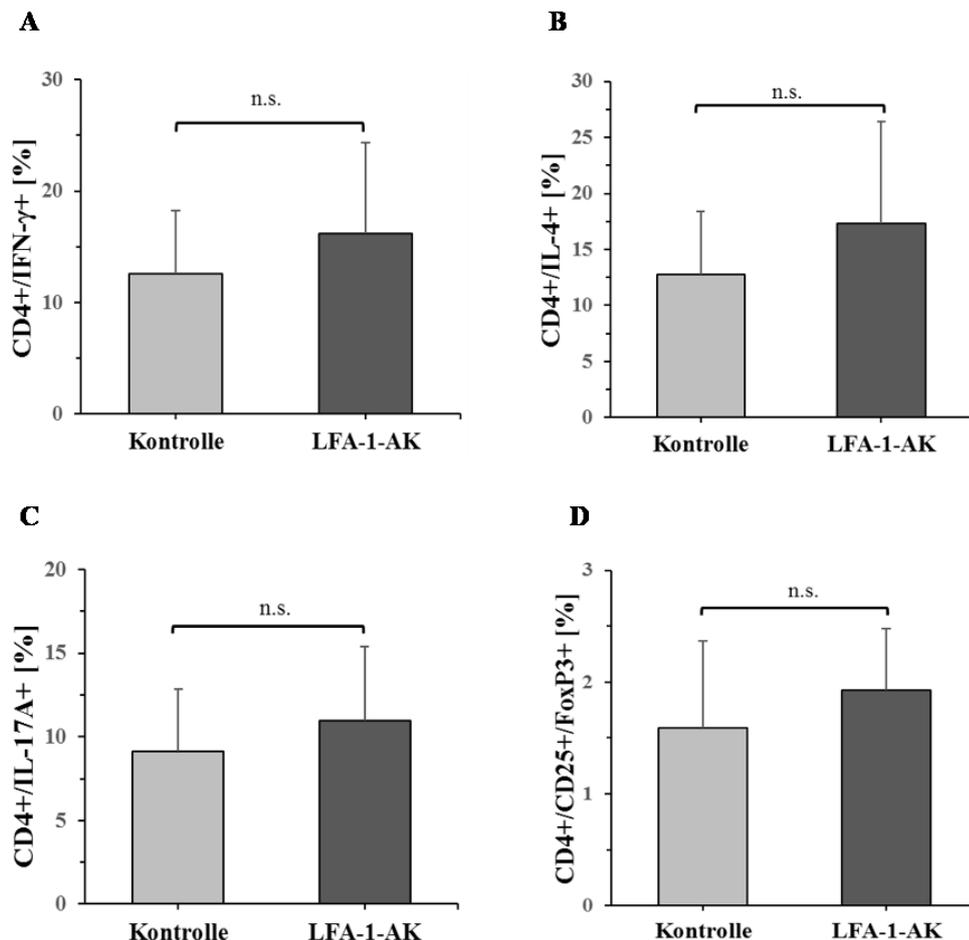


Abbildung 14: Prozentualer Anteil der CD4+ Subpopulationen in der Milz nach LFA-1-Antikörpertherapie

Darstellung des prozentualen Anteils der CD4+ Subpopulationen in der Milz an Tag 21 bei immunisierten/ unbehandelten Kontrolltieren (Kontrolle) verglichen mit immunisierten/ LFA-1-AK behandelten Tieren (LFA-1-AK). Bestimmung anhand Durchflusszytometrie. Kontrolle: $n = 14$, LFA-1-AK: $n = 19$. $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant gewertet. n.s. = nicht signifikant.

4.2.2 Evaluation des entzündlichen kardialen Infiltrates mittels Durchflusszytometrie

Nach der histologischen Betrachtung der Herzen wurde im nächsten Schritt das entzündliche kardiale Infiltrat mit Hilfe der Durchflusszytometrie untersucht. Ziel war, es den Anteil bestimmter Leukozytensubpopulationen im Herzen nach Gabe des VLA-4-Antikörpers zu evaluieren.

4.2.2.1 CD45+ Zellen

Im Gegensatz zu den histologischen Analysen zeigte sich in der Durchflusszytometrie eine Reduktion der leukozytären Infiltration in das Herz durch die Blockade von VLA-4. Die mit VLA-4-Antikörper behandelten Tiere wiesen im Vergleich zu den unbehandelten Mäusen eine signifikante Reduktion der in das Herz eingewanderten CD45+ Zellen auf ($4,38 \pm 4,65$ % vs. $10,0 \pm 8,26$ %, $p = 0,015$, Abb. 16 C). Die Abbildungen 16 A und B zeigen repräsentative FACS-Scattergramme der CD45+ Zellen im Herzen.

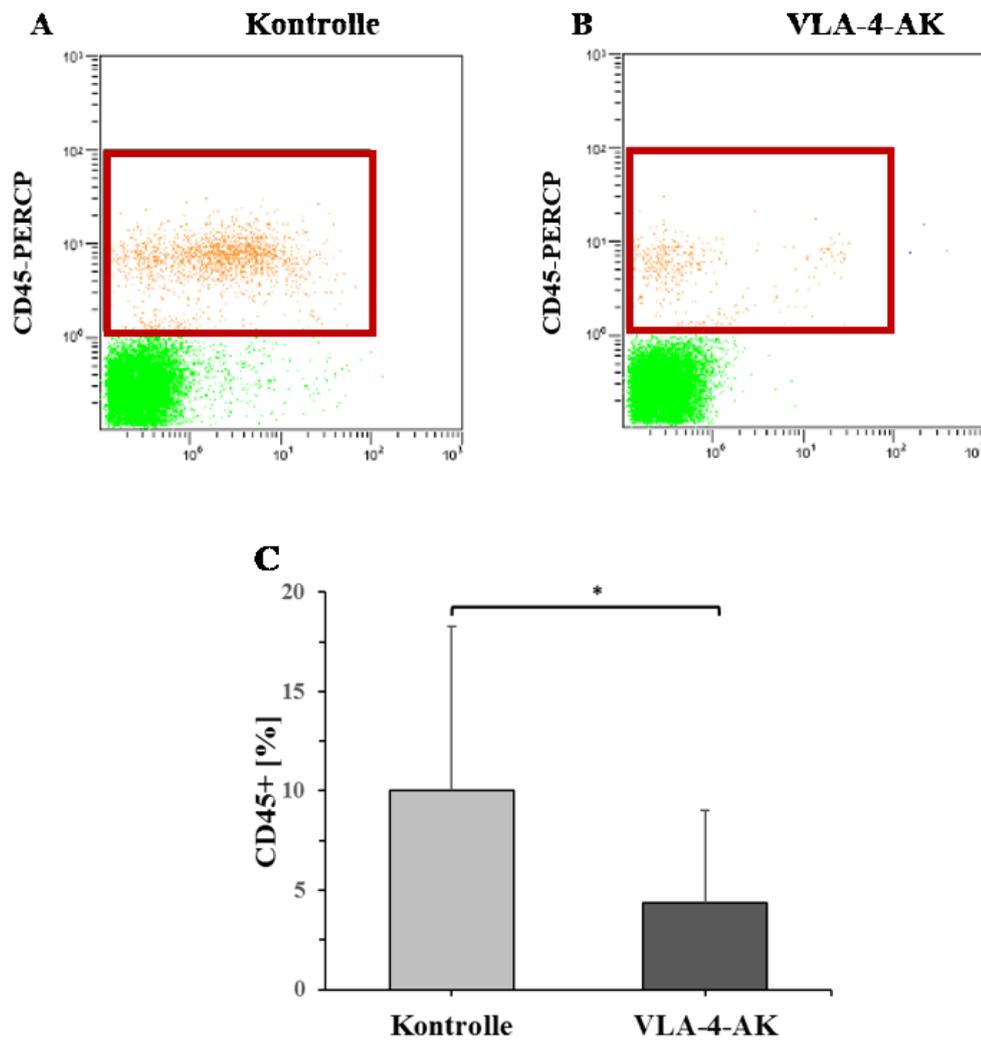


Abbildung 16: FACS-Analysen von CD45+ Zellen im Herzen nach VLA-4-Antikörpertherapie

Darstellung der FACS-Analysen von in das Herz eingewanderten CD45+ Zellen an Tag 21 der EAM. Bild A und B zeigen repräsentative FACS-Scattergramme. Die CD45+ Zellen sind durch einen roten Rahmen hervorgehoben. Bild A stammt von einem immunisierten/unbehandelten Tier, Bild B von einem immunisiertem/VLA-4-AK behandeltem Tier. Bild C stellt den prozentualen Anteils von CD45+ Zellen im Herzen an Tag 21 bei immunisierten/ unbehandelten Kontrolltieren (Kontrolle) verglichen mit immunisierten/ VLA-4-AK behandelten Tieren (VLA-4-AK). Bestimmung anhand Durchflusszytometrie. Kontrolle: n = 15, VLA-4-AK: n = 18. p < 0,05 wurden als statistisch signifikant gewertet. *: p < 0,05

4.2.2.2 CD45+/CD11b+ Zellen und CD45+/CD11b+/Gr-1+ Zellen

Weiterhin führte die Blockade von VLA-4 im Vergleich zu den unbehandelten Kontrolltieren zu einer signifikanten Reduktion der CD45+/CD11b+ Zellen im Herzen ($2,40 \pm 2,33$ % vs. $4,27 \pm 3,31$ %, $p = 0,0045$, Abb. 17).

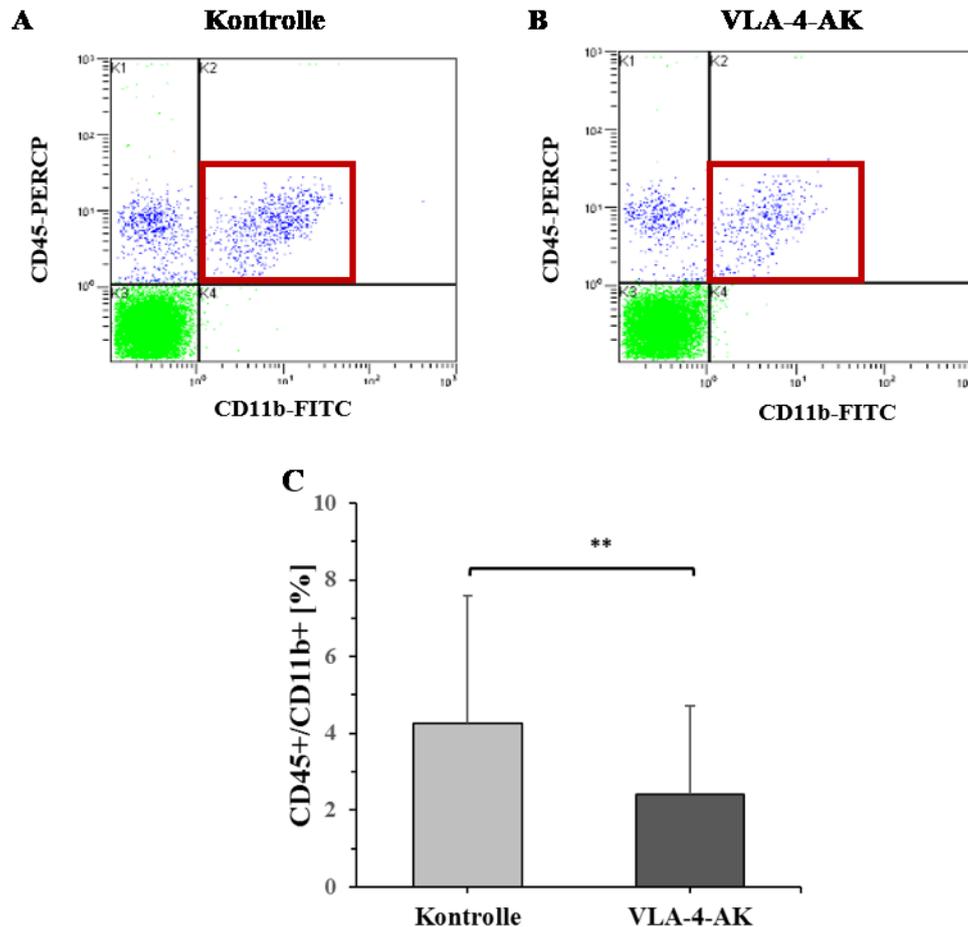


Abbildung 17: FACS-Analysen der CD45+/CD11b+ Zellen im Herzen nach VLA-4-Antikörpertherapie

Darstellung der FACS-Analysen von in das Herz eingewanderten CD45+/CD11b+ Zellen an Tag 21 der EAM. Bild A und B zeigen repräsentative FACS-Scattergramme. Die y-Achse repräsentiert die CD45+ Zellen, die x-Achse die CD11b+ Zellen. Die doppelt positiven Zellen sind von einem roten Rahmen umgeben. Bild A stammt von einem immunisierten/unbehandeltem Tier, Bild B von einem immunisierten/VLA-4-AK behandelten Tier. Bild C stellt den prozentualen Anteil der CD45+/CD11b+ Zellen im Herzen an Tag 21 bei immunisierten/ unbehandelten Kontrolltieren (Kontrolle) verglichen mit immunisierten/ VLA-4-AK behandelten Tieren (VLA-4-AK). Bestimmung anhand von Durchflusszytometrie. Kontrolle: $n = 15$, VLA-4-AK: $n = 19$. $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant gewertet. **: $p < 0,01$. n.s. = nicht signifikant.

Im Gegensatz dazu zeigte sich kein Unterschied zwischen mit VLA-4-Antikörper behandelten und unbehandelten Tieren hinsichtlich des Anteils der CD45+/CD11b/Gr-1+ Zellen ($1,95 \pm 2,63$ % vs. $2,10 \pm 1,87$ %, $p = 0,338$, Abb. 18). Da neutrophile Granulozyten VLA-4 nicht auf ihrer Zelloberfläche exprimieren, ist anzunehmen, dass ihre Infiltration in das entzündete Myokard auch nicht durch die Blockade von VLA-4 beeinflusst wird.

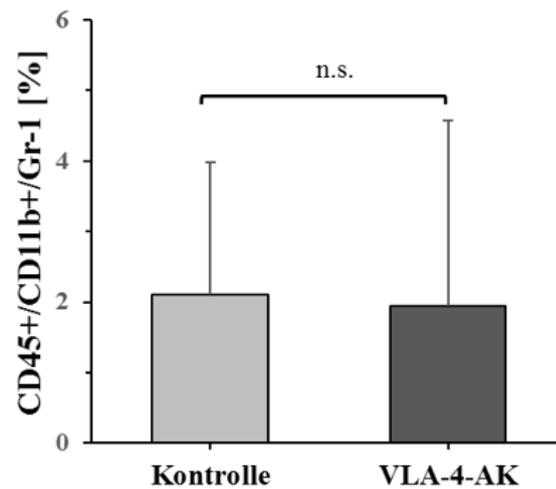


Abbildung 18: Prozentualer Anteil der CD45+/CD11b+/Gr-1+ Zellen im Herzen nach VLA-4-Antikörpertherapie

Darstellung des prozentualen Anteils der CD45+/CD11b+/Gr-1+ Zellen im Herzen an Tag 21 bei immunisierten/ unbehandelten Kontrolltieren (Kontrolle) verglichen mit immunisierten/ VLA-4-AK behandelten Tieren (VLA-4-AK). Bestimmung anhand von Durchflusszytometrie. Kontrolle: $n = 15$, VLA-4-AK: $n = 19$. $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant gewertet. **: $p < 0,01$. n.s. = nicht signifikant.

4.2.2.3 CD45+/Prominin-1+ Zellen

Unsere Arbeitsgruppe konnte bereits zeigen, dass es nach Gabe eines VLA-4-Antikörpers an Tag 21 zu einer reduzierten kardialen Infiltration von CD45+/Prominin-1+ an Tag 49 kommt [120]. In der vorliegenden Arbeit konnte nun gezeigt werden, dass auch die VLA-4-Antikörpertherapie an Tag 14 und 18 bereits an Tag 21 zu einer signifikanten Reduktion der in das Herz eingewanderten CD45+/Prominin-1+ Zellen führt ($0,65 \pm 0,68$ % vs. $1,34 \pm 1,05$ %, $p = 0,033$, Abb. 19).

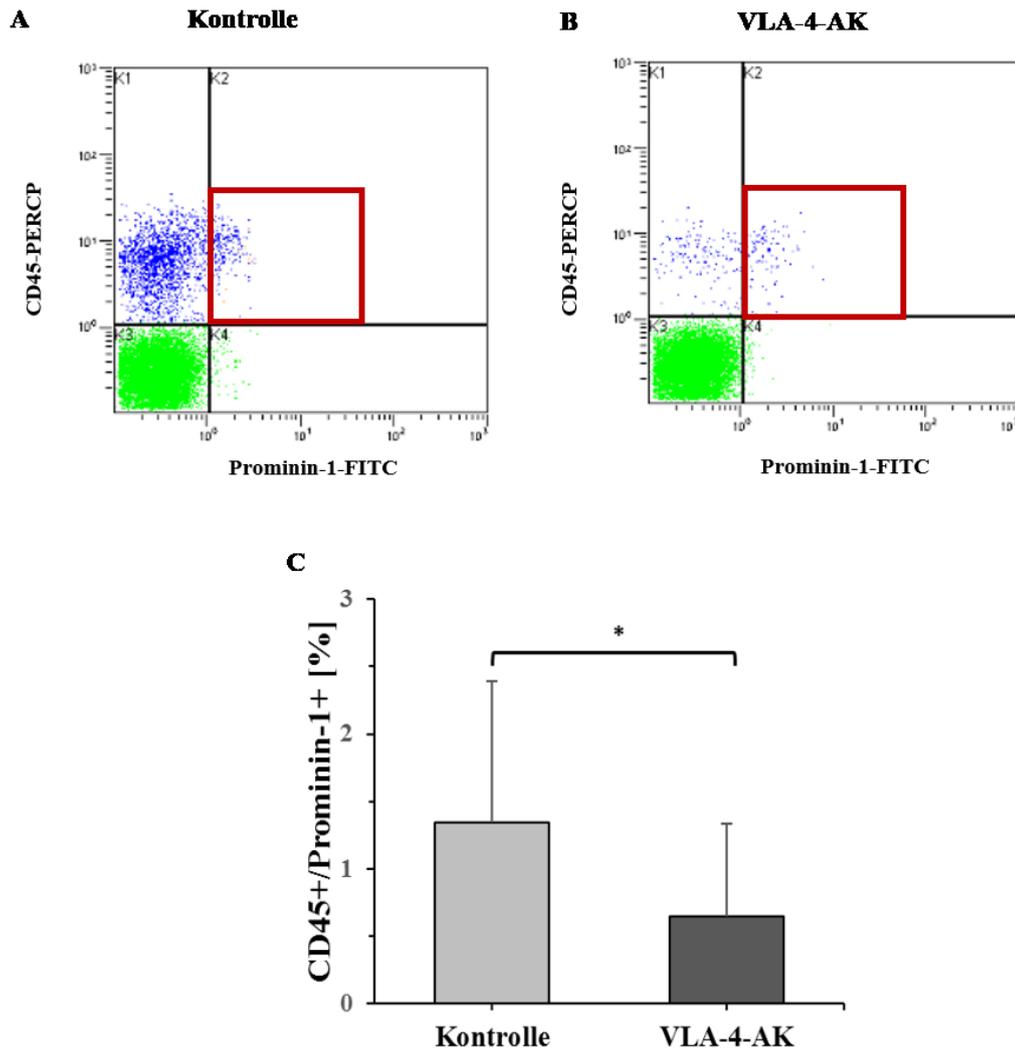


Abbildung 19: FACS-Analysen der CD45+/Prominin-1+ Zellen im Herzen nach VLA-4-Antikörpertherapie

Darstellung der FACS-Analysen von in das Herz eingewanderten CD45+/Prominin-1+ Zellen Tag 21 der EAM. Bild A und B zeigen repräsentative FACS-Scattergramme. Die y-Achse repräsentiert die CD45+ Zellen, die x-Achse die Prominin-1+ Zellen. Die doppelt positiven Zellen sind von einem roten Rahmen umgeben. Bild A stammt von einem immunisierten/unbehandeltem Tier, Bild B von einem immunisierten/VLA-4-AK behandelten Tier. Bild C stellt den prozentualen Anteil von CD45+/Prominin-1 Zellen im Herzen an Tag 21 bei immunisierten/ unbehandelten Kontrolltieren (Kontrolle) verglichen mit immunisierten/VLA-4-AK behandelten Tieren (VLA-4-AK). Bestimmung anhand von Durchflusszytometrie. Kontrolle: n = 15, VLA-4-AK: n = 19. $p < 0,05$ wurden als statistisch signifikant gewertet. *: $p < 0,05$

4.2.2.4 CD4+ Zellen

Der Anteil der CD4+ T-Helferzellen wurde durch die Blockade von VLA-4 nicht beeinflusst. Er lag bei den mit VLA-4-Antikörper behandelten Tieren bei $7,91 \pm 2,55$ %, bei den unbehandelten Kontrolltieren bei $11,2 \pm 6,70$ % ($p = 0,187$, Abb. 20).

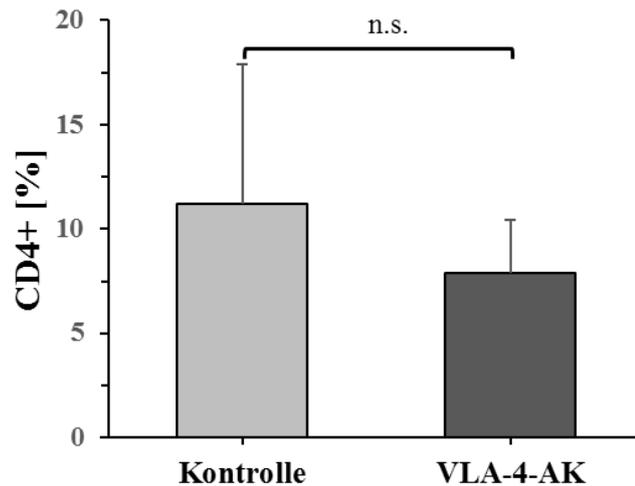


Abbildung 20: Prozentualer Anteil der CD4+ Zellen im Herzen nach VLA-4-Antikörpertherapie

Darstellung des prozentualen Anteils von CD4+ Zellen im Herzen an Tag 21 bei immunisierten/unbehandelten Kontrolltieren (Kontrolle) verglichen mit immunisierten/ VLA-4-AK behandelten Tieren (VLA-4-AK). Bestimmung anhand von Durchflusszytometrie. Kontrolle: n = 15, VLA-4-AK: n = 19. $p < 0,05$ wurden als statistisch signifikant gewertet. n.s. = nicht signifikant.

4.2.2.5 T-regulatorische Zellen

Nach Gabe des VLA-4-Antikörpers zeigte sich kein Unterschied in der Menge der im Herzen nachgewiesenen T-regulatorischen (CD4+/CD25+/FoxP3+) Zellen verglichen mit den unbehandelten Kontrolltieren ($0,48 \pm 0,14$ % vs. $0,59 \pm 0,50$ %, $p = 0,549$, Abb. 21).

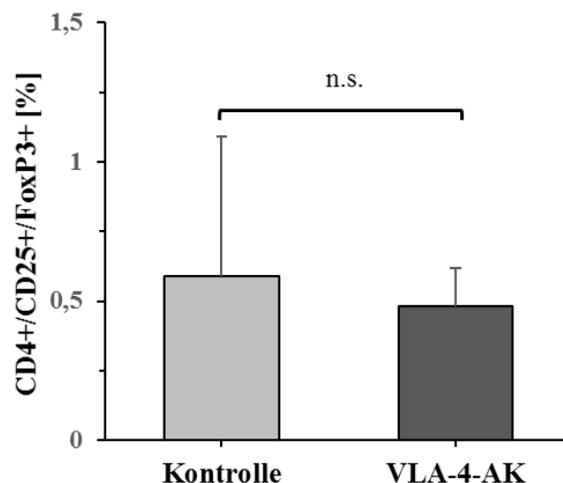


Abbildung 21: Prozentualer Anteil der T-regulatorischen Zellen im Herzen nach VLA-4-Antikörpertherapie

Darstellung des prozentualen Anteils der CD4+/CD25+/FoxP3+ Zellen im Herzen an Tag 21 bei immunisierten/ unbehandelten Kontrolltieren (Kontrolle) verglichen mit immunisierten/ VLA-4-AK behandelten Tieren (VLA-4-AK). Bestimmung anhand von Durchflusszytometrie. Kontrolle: n = 15, VLA-4-AK: n = 7. $p < 0,05$ wurden als statistisch signifikant gewertet. n.s. = nicht signifikant.

4.2.2.6 Th1-/ Th2-/ Th17-Zellen

Ebenso zeigte sich nach der Blockade von VLA-4 kein signifikanter Unterschied in der Menge der in das Herz eingewanderten Th1-, Th2- und Th17-Zellen. Allerdings wiesen die mit VLA-4-Antikörper behandelten Tiere im Vergleich zu den unbehandelten Kontrolltieren einen deutlichen Trend hinsichtlich einer Reduktion der Th2-Zellen auf ($6,73 \pm 2,39\%$ vs. $10,3 \pm 5,71\%$, $p = 0,053$, Abb. 22B).

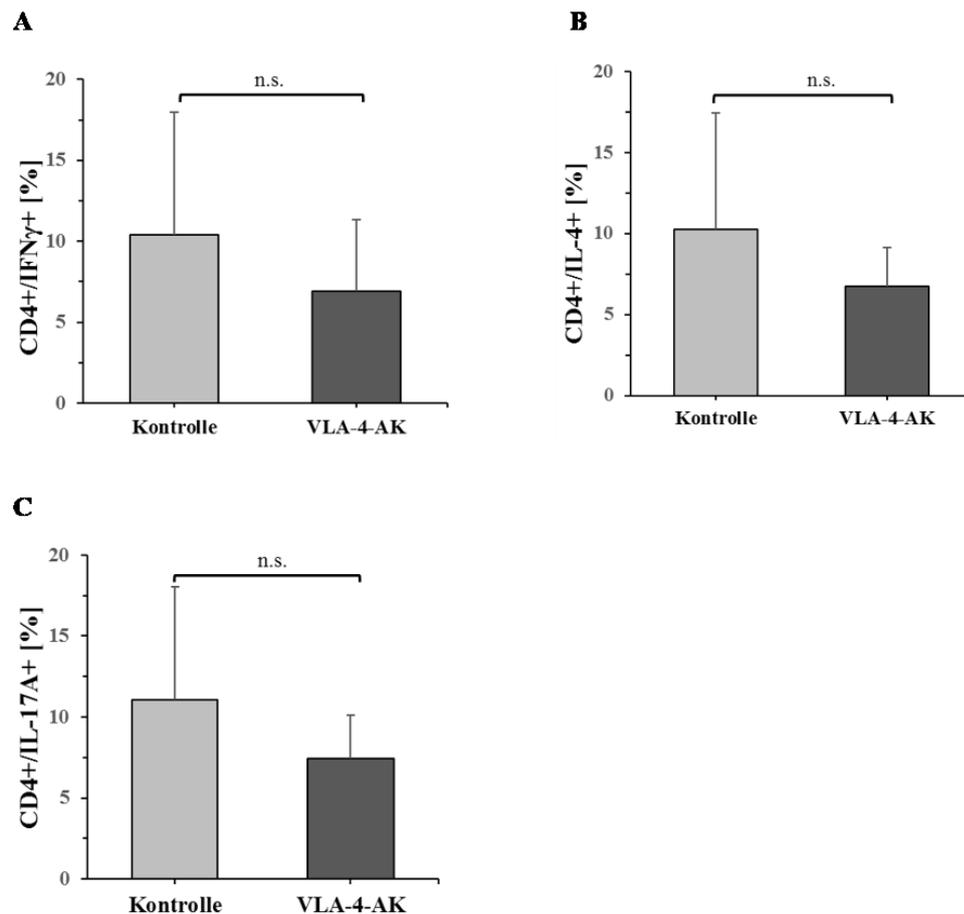


Abbildung 22: Prozentualer Anteil der Th-Subpopulationen im Herzen nach VLA-4-Antikörpertherapie

Darstellung des prozentualen Anteils der Th-Zellpopulationen im Herzen an Tag 21 bei immunisierten/unbehandelten Kontrolltieren (Kontrolle) verglichen mit immunisierten/ VLA-4-AK behandelten Tieren (VLA-4-AK). Bestimmung anhand von Durchflusszytometrie. Kontrolle: $n = 15$, VLA-4-AK: $n = 18$. $p < 0,05$ wurden als statistisch signifikant gewertet. n.s. = nicht signifikant.

4.2.3 Evaluation der CD4+ Subpopulationen in der Milz

Um die Rolle der VLA-4/VCAM-1-Interaktion in der Rekrutierung der T-Zellen zu untersuchen, wurde die Milz der Versuchstiere an Tag 21 mittels Durchflusszytometrie analysiert. Nach VLA-4-Antikörpertherapie zeigte sich im Vergleich zu den unbehandelten Tieren ein signifikanter Anstieg der T-regulatorischen Zellen in der Milz ($2,97 \pm 0,83$ % vs. $1,59 \pm 0,78$ %, $p = 0,004$, Abb. 23).

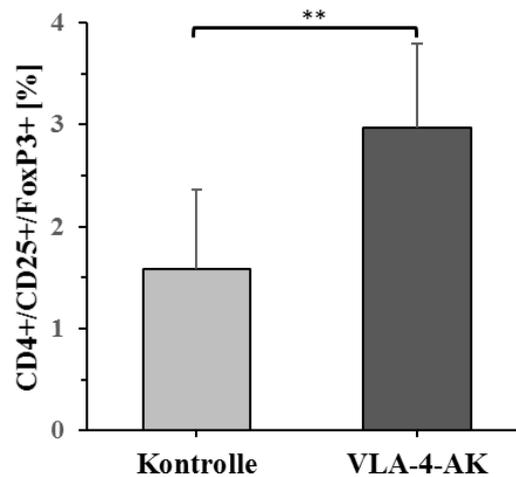


Abbildung 23: Prozentualer Anteil der T-regulatorischen Zellen in der Milz nach VLA-4-Antikörpertherapie

Darstellung des prozentualen Anteils der CD4+/CD25+/FoxP3+ Zellen in der Milz an Tag 21 bei immunisierten/ unbehandelten Kontrolltieren (Kontrolle) verglichen mit immunisierten/ VLA-4-AK behandelten Tieren (VLA-4-AK). Bestimmung anhand von Durchflusszytometrie. Kontrolle: $n = 15$, VLA-4-AK: $n = 7$. $p < 0,05$ wurden als statistisch signifikant gewertet. **: $p < 0,01$

Auch die Th1-Zellen waren nach Gabe des VLA-4-Antikörpers im Vergleich zu den unbehandelten Kontrolltieren signifikant erhöht ($18,1 \pm 5,1$ % vs. $12,6 \pm 5,7$ %, $p = 0,009$, Abb. 24A).

Ebenso verhielt es sich mit den Th2-Zellen. Nach Blockade von VLA-4 zeigte sich ein signifikanter Anstieg der CD4+/IL-4+ Zellen im Vergleich zu den unbehandelten Kontrolltieren ($18,5 \pm 4,7$ % vs. $12,8 \pm 5,6$ %, $p = 0,034$, Abb. 24B).

Lediglich auf die Th17-Zellen hatte die Gabe des VLA-4-Antikörpers keinen Einfluss. Die Menge der CD4+/IL-17A+ Zellen war nach VLA-4-Antikörpertherapie im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen unverändert ($10,5 \pm 2,6$ % vs. $9,2 \pm 3,7$ %, $p = 0,267$, Abb. 24C).

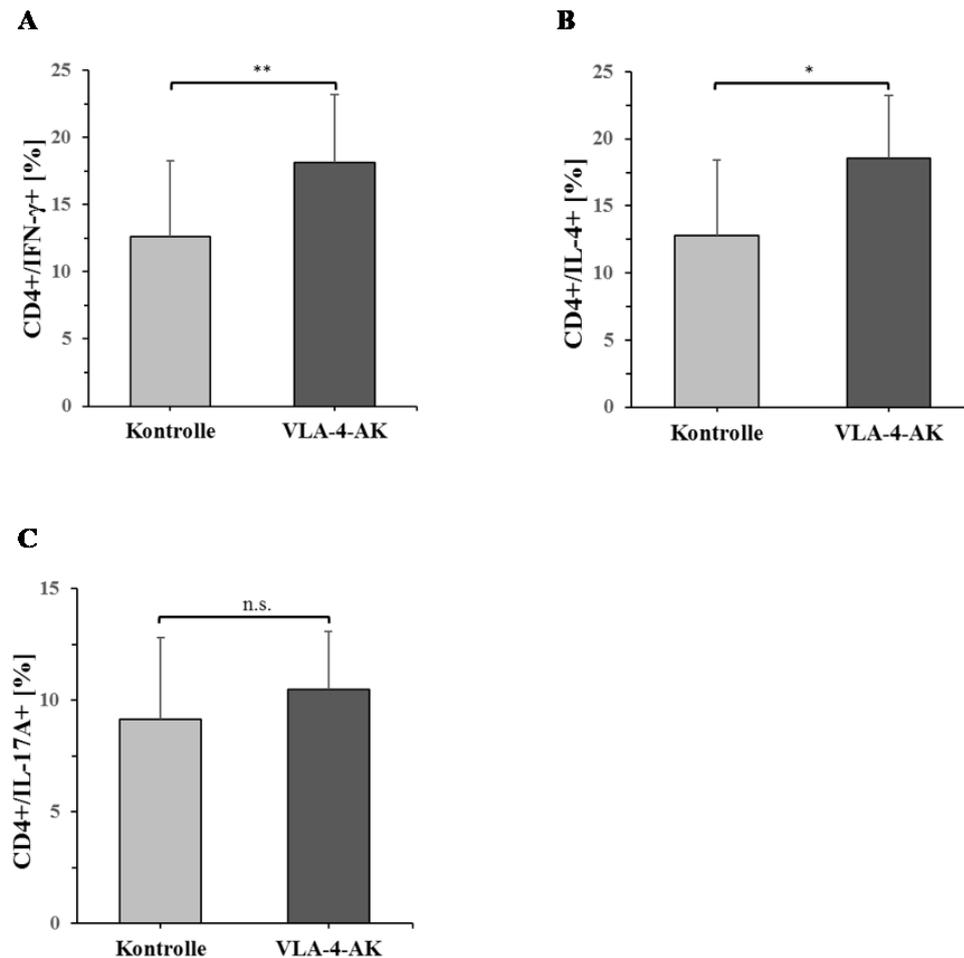


Abbildung 24: Prozentualer Anteil der Th-Subpopulationen in der Milz nach VLA-4-Antikörpertherapie

Darstellung des prozentualen Anteils der Th-Zellpopulationen in der Milz an Tag 21 bei immunisierten/unbehandelten Kontrolltieren (Kontrolle) verglichen mit immunisierten/ VLA-4-AK behandelten Tieren (VLA-4-AK). Bestimmung anhand von Durchflusszytometrie. Kontrolle: n = 15, VLA-4-AK: n = 17. $p < 0,05$ wurden als statistisch signifikant gewertet. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$. n.s. = nicht signifikant.

4.2.4 Analyse des Zytokinmilieus im Herzen durch quantitative Real-time RT-PCR

Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Blockade von VLA-4 zu einer Reduktion der leukozytären Infiltration in das Herz an Tag 21 führt. Die infiltrierenden Entzündungszellen sind unter anderem durch die Freisetzung von verschiedenen Zytokinen maßgeblich an der Progression der Myokarditis zu einer DCM beteiligt [67]. Folglich wäre zu erwarten, dass sich die Blockade von VLA-4 auch auf das Zytokinmilieu im Herzen auswirkt. Um dies zu evaluieren, wurden die Herzen an Tag 21 entnommen und mit Hilfe einer quantitativen Real-time RT-PCR die Expression verschiedener pro- und antiinflammatorischer Zytokine untersucht.

Hierbei ließ sich kein signifikanter Unterschied in der relativen Expression der proinflammatorischen Zytokine TNF- α und IL-6 zwischen mit VLA-4-Antikörper behandelten Tieren und den unbehandelten Kontrolltieren an Tag 21 feststellen (Abb. 25 A,B).

In den FACS-Analysen konnten wir keinen Unterschied in der kardialen Infiltration von Th1-Zellen nach VLA-4-Antikörpertherapie feststellen. Wie zu erwarten hatte die Blockade von VLA-4 keinen Einfluss auf die relative Expression von IFN- γ im Vergleich zu den unbehandelten Kontrolltieren ($3,7 \pm 8,3$ vs. $7,7 \pm 14,4$, $p = 0,79$, Abb. 25C). Ebenso verhielt es sich mit IL-12, einem weiteren Th1-Zytokin, das vor allem in der Entwicklung der Th1-Zellen eine wichtige Rolle spielt [129]. Nach Gabe des VLA-4-Antikörpers zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der relativen Expression von IL-12 im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen ($0,6 \pm 0,6$ vs. $4,5 \pm 7,1$, $p = 0,13$, Abb. 25D).

Wie nach den Ergebnissen der Durchflusszytometrie, die keinen Unterschied in der Anzahl der Th17-Zellen nach VLA-4-Antikörpertherapie nachweisen konnten, zu erwarten, war auch die relative Expression von IL-17A im Herzen nach Blockade von VLA-4 verglichen mit unbehandelten Kontrolltieren unverändert ($0,9 \pm 0,9$ vs. $17,4 \pm 34,3$, $p = 0,86$, Abb. 26G).

Bezüglich der Th2-Zellen konnten wir anhand des FACS einen deutlichen Trend hinsichtlich einer reduzierten Infiltration in das Herz an Tag 21 nach Gabe des VLA-Antikörpers nachweisen. Dies spiegelte sich jedoch nicht in der relativen Expression von IL-4 wider. Bei den behandelten Tiere konnte keine Reduktion der relativen Expression von IL-4 im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen an Tag 21 gezeigt werden ($1,1 \pm 0,9$ vs. $16,7 \pm 32,4$, $p = 0,54$, Abb. 25E). Auch auf die Expression von IL-10, eines weiteren Th2-Zytokins [129], hatte die Blockade von VLA-4 keinen Einfluss ($1,6 \pm 1,9$ vs. $2,7 \pm 3,0$, $p = 0,72$, Abb. 26F).

Des Weiteren wurde die Auswirkung der VLA-4-Antikörpertherapie auf die relative Expression des am kardialen Remodeling beteiligten profibrotischen Zytokins TGF- β untersucht. Hierbei konnte kein Unterschied zwischen behandelten und unbehandelten Tieren festgestellt werden ($3,2 \pm 1,5$ vs. $2,2 \pm 2,4$, $p = 0,19$, Abb. 25H).

Einschränkend muss jedoch angemerkt werden, dass alle Ergebnisse eine sehr hohe Standardabweichung aufwiesen.

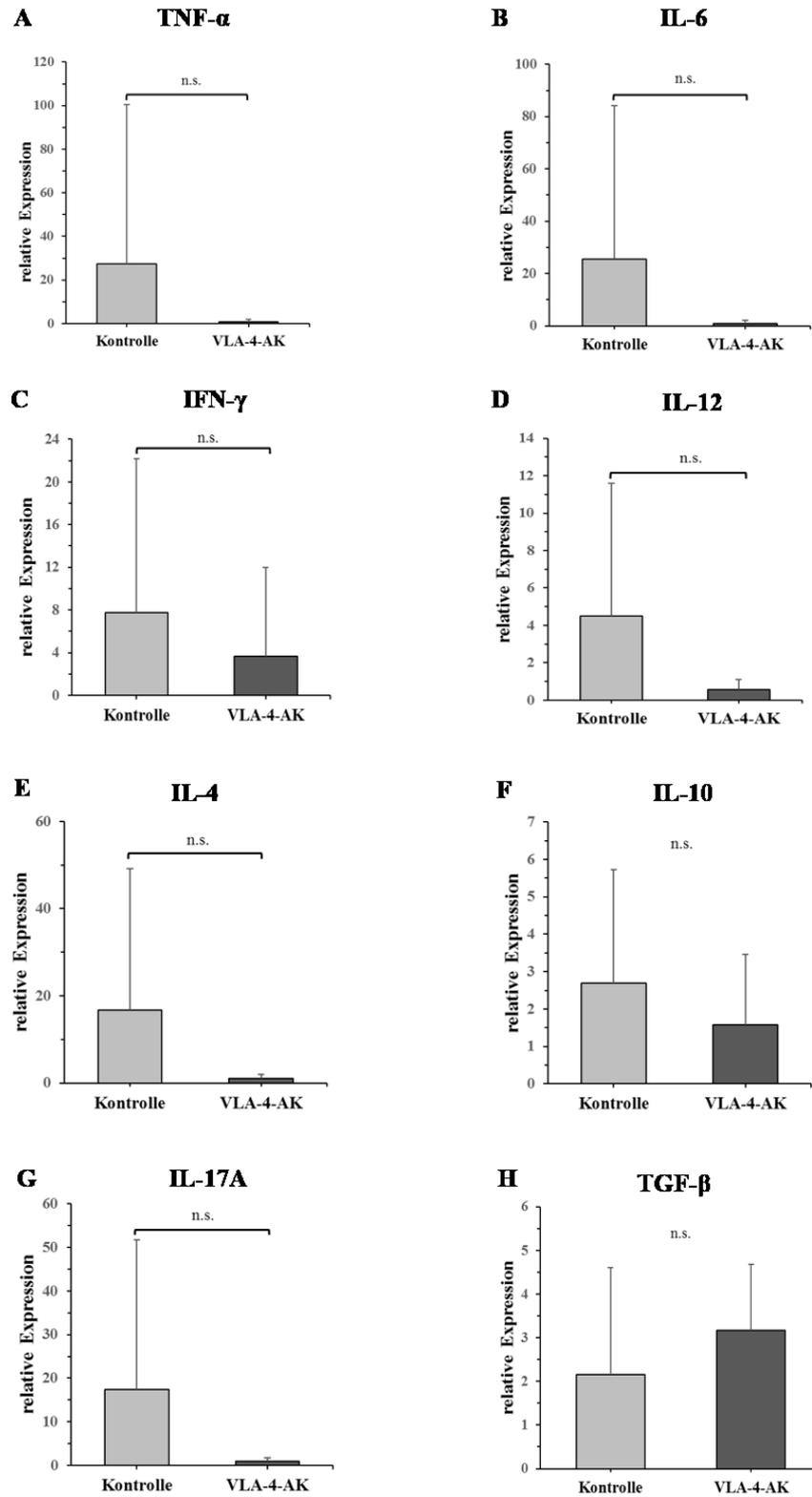


Abbildung 25: Relative Expression von Zytokinen im Herzen nach VLA-4-Antikörpertherapie

Darstellung der relativen Expression von ausgewählten pro- und antiinflammatorischen Zytokinen im Herzen an Tag 21 bei immunisierten, unbehandelten Kontrolltieren (Kontrolle) verglichen mit VLA-4-AK behandelten Tieren (VLA-4-AK). Bestimmung anhand von quantitativer Real time RT-PCR. Kontrolle: n = 9, VLA-4-AK: n = 9. $p < 0,05$ wurden als statistisch signifikant gewertet. n.s. = nicht signifikant.

4.2.5 Analyse des Zytokinmilieus in der Milz durch quantitative Real-time RT-PCR

Anhand der FACS-Analyse der Milz an Tag 21 konnte gezeigt werden, dass die Blockade von VLA-4 zu einer Veränderung des CD4⁺ T-Helferzell-Profiles in der Milz führt. Es kam zu einem Anstieg der Th1- und Th2-Zellen. Im Folgenden sollte nun mit Hilfe der quantitativen Real-time RT-PCR untersucht werden, ob sich die VLA-4-Antikörpertherapie auch auf die Zytokinexpression in der Milz auswirkt.

Hinsichtlich der Expression von IFN- γ konnte kein signifikanter Unterschied zwischen mit VLA-4-Antikörper behandelten Tieren und den unbehandelten Kontrollen an Tag 21 nachgewiesen werden ($7,0 \pm 11,6$ vs. $6,4 \pm 13,2$, $p = 0,62$, Abb. 26A). Ebenso hatte die Blockade von VLA-4 keinen Einfluss auf die relative Expression von IL-4 ($45,3 \pm 81,9$ vs. $5,0 \pm 8,4$, $p = 0,21$, Abb. 26B).

Zwar ließ sich nach Gabe des VLA-4-Antikörpers kein signifikanter Unterschied in der relativen Expression von IL-17A nachweisen, jedoch zeigte sich ein deutlicher Trend hinsichtlich einer erhöhten Expression im Vergleich zu den unbehandelten Kontrolltieren ($82,2 \pm 65,5$ vs. $16,8 \pm 29,0$, $p = 0,066$, Abb. 26C).

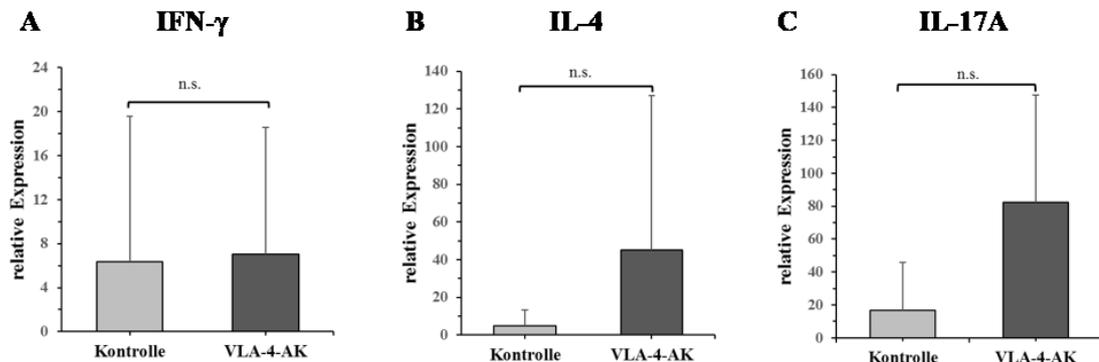


Abbildung 26: Relative Expression von Zytokinen in der Milz nach VLA-4-Antikörpertherapie

Darstellung der relativen Expression von ausgewählten Zytokinen in der Milz an Tag 21 bei immunisierten/ unbehandelten Kontrolltieren (Kontrolle) verglichen mit immunisierten/ VLA-4-AK behandelten Tieren (VLA-4-AK). Bestimmung anhand von quantitativer realtime RT-PCR. Kontrolle: $n = 7$, VLA-4-AK: $n = 4$. $p < 0,05$ wurden als statistisch signifikant gewertet. n.s. = nicht signifikant.

4.2.6 Beurteilung der kardialen Funktion mittels Echokardiographie

Mittels FACS-Analysen konnten wir zeigen, dass die Blockade von VLA-4 zu einer reduzierten Leukozyteninfiltration in das Myokard an Tag 21 führt. Nun stellte sich die Frage, ob die Reduktion des entzündlichen Infiltrates Auswirkungen auf den chronischen Verlauf der EAM hat und die Entwicklung einer iDCM sowie der damit einhergehenden Einschränkung der kardialen Funktion beeinflusst. Dazu wurden die Tiere wie unter 3.3.8.2 beschrieben mit einem Kleintierechokardiographiesystem untersucht und die nachfolgenden Parameter zur Einschätzung der linksventrikulären Funktion erhoben. Als Untersuchungszeitpunkt für den chronischen Verlauf der EAM wurde Tag 49 nach Immunisierung der Tiere gewählt. Um Aussagen über die zeitliche Entwicklung der Herzfunktion treffen zu können, wurde eine Ausgangsuntersuchung der Mäuse an Tag 0 vor der ersten Immunisierung durchgeführt.

4.2.6.1 Bestimmung von enddiastolischem (EDV) und endsystolischem Volumen (ESV)

Zwei Parameter zur Evaluation des kardialen Remodelings sind das enddiastolische (EDV) sowie das endsystolische Volumen (ESV) [131]. Wenn man die echokardiographischen Messungen der immunisierten unbehandelten Tiere an Tag 0 und Tag 49 vergleicht, kommt es zu einer signifikanten Zunahme sowohl des ESV ($p = 0,009$, Abb. 28A) als auch des EDV ($p = 0,023$, Abb. 28B), was den natürlichen Krankheitsverlauf einer EAM mit Entwicklung einer DCM widerspiegelt.

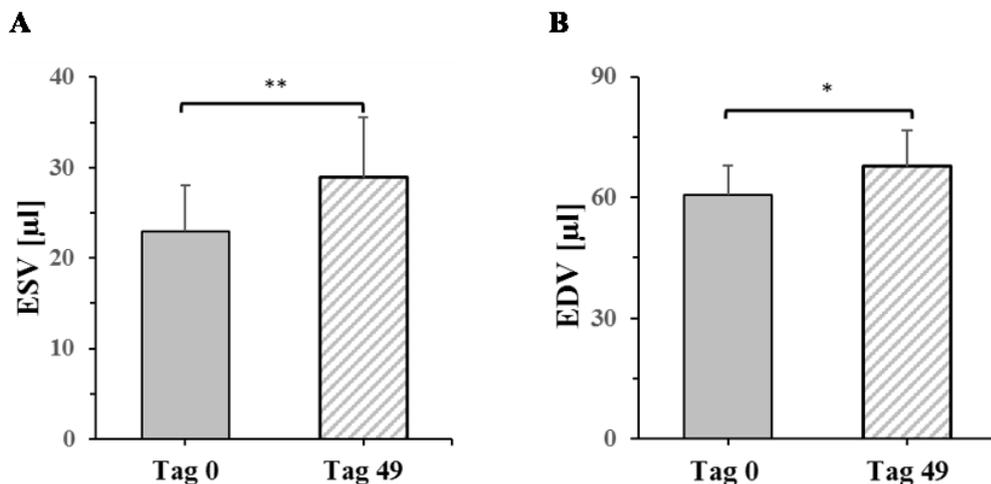


Abbildung 27: Zeitlicher Verlauf des ESV und EDV im Rahmen der EAM

Vergleich von ESV (A) und EDV (B) an Tag 0 und Tag 49 bei immunisierten/ unbehandelten Tieren. Erfassung anhand der Kleintierechokardiographie. $n = 20$. $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant gewertet. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$.

Die Bestimmung der Volumina an Tag 49 ergab jedoch keinen Unterschied zwischen behandelter und unbehandelter Gruppe. Allerdings zeigte sich bei den mit VLA-4-Antikörper behandelten Tieren im Vergleich zu den unbehandelten Kontrolltieren ein deutlicher Trend hinsichtlich eines verringerten ESV ($24,5 \pm 6,0 \mu\text{l}$ vs. $28,6 \pm 6,7 \mu\text{l}$, $p = 0,052$, Abb. 29A).

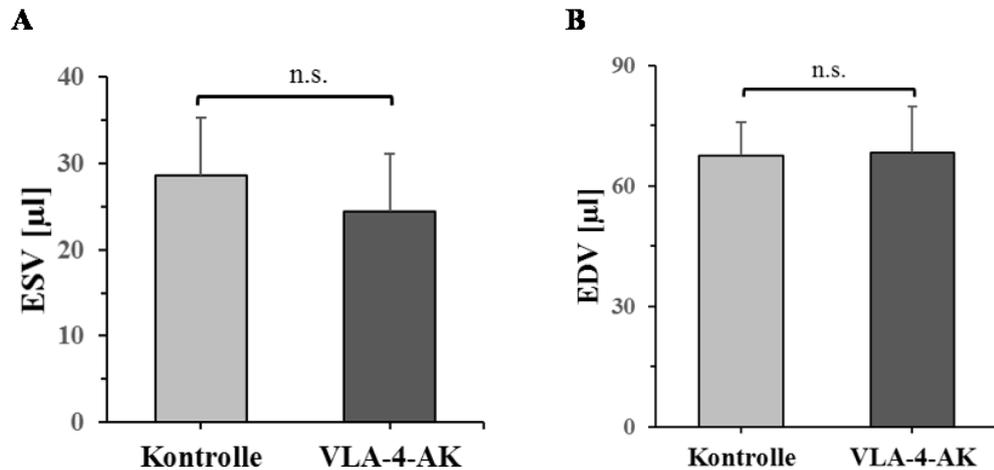


Abbildung 28: Vergleich von ESV und EDV nach VLA-4-Antikörpertherapie

Darstellung von ESV (A) und EDV (B) bei immunisierten/ unbehandelten Kontrolltieren (Kontrolle) verglichen mit immunisierten/ VLA-4-AK behandelten Tieren (VLA-4-AK) an Tag 49. Erfassung anhand der Kleintierechokardiographie. Kontrolle: $n = 20$, VLA-4-AK: $n = 19$. $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant gewertet. n.s. = nicht signifikant.

4.2.6.2 Bestimmung der linksventrikulären Ejektionsfraktion (LVEF)

Die LVEF beschreibt das Schlagvolumen des Herzens als Prozentsatz des linksventrikulären enddiastolischen Volumens und dient somit der Beurteilung der kardialen Pumpfunktion [132]. Vergleicht man die gemessene LVEF an Tag 0 und Tag 49 zeigt sich bei den unbehandelten Kontrolltieren eine signifikante Reduktion der Pumpfunktion. An Tag 0 betrug die LVEF $62,5 \pm 5,9 \%$, an Tag 49 $57,5 \pm 6,4 \%$ ($p = 0,029$, Abb. 30).

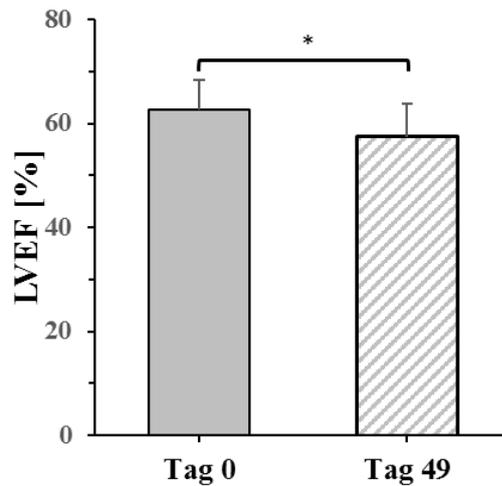


Abbildung 29: Zeitlicher Verlauf der LVEF im Rahmen der EAM

Darstellung der LVEF an Tag 0 und Tag 49 bei immunisierten/ unbehandelten Tieren. Erfassung anhand der Kleintierechokardiographie. $n = 20$. $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant gewertet. *: $p < 0,05$.

Die mit VLA-4-Antikörper behandelten Tieren entwickelten im Vergleich zur Ausgangsmessung an Tag 0 keine Einschränkung der LVEF ($61,3 \pm 7,0$ % an Tag 0, $63,6 \pm 4,8$ % an Tag 49, $p = 0,28$). Betrachtet man die Messungen an Tag 49, zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen den zwei Versuchsgruppen. Die mit VLA-4-Antikörper therapierte Gruppe wies im Vergleich zur unbehandelten Gruppe eine signifikant bessere LVEF auf ($p = 0,002$, Abb. 31). Die Abbildung 30 zeigt repräsentative echokardiographische Aufnahmen im M-Mode der kurzen parasternalen Achse von immunisierten Kontrolltieren und mit VLA-4-AK behandelten Tieren, anhand derer die LVEF ermittelt wird.

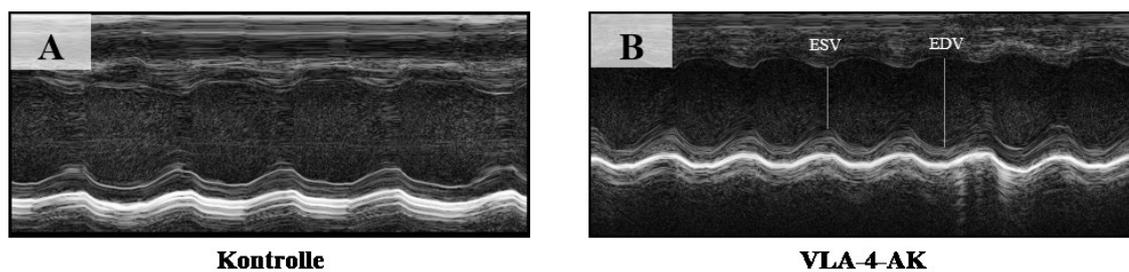


Abbildung 30: Bestimmung der kardialen Funktion an Tag 49 nach VLA-4-Antikörpertherapie anhand der Kleintierechokardiographie

Mithilfe eines Kleintierechokardiographiesystems wurde die kardiale Funktion an Tag 49 nach Induktion der EAM untersucht. Darstellung repräsentativer Aufnahmen im M-Mode der kurzen parasternalen Achse. Bild A zeigt die Aufnahme des Herzens eines immunisierten unbehandelten Tieres, Bild B eines mit VLA-4-Antikörper behandelten Tieres.

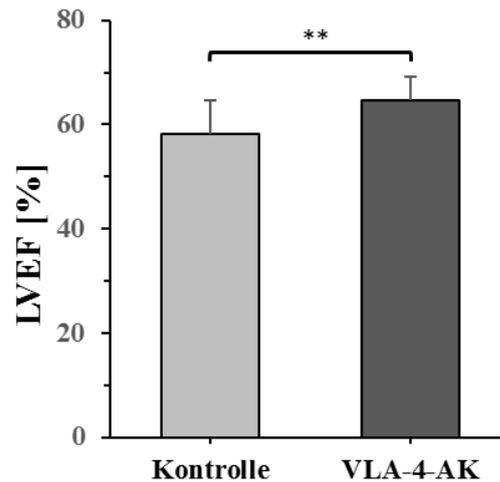


Abbildung 31: Vergleich der LVEF nach VLA-4-Antikörpertherapie

Vergleich der LVEF bei immunisierten/ unbehandelten Kontrolltieren (Kontrolle) verglichen mit immunisierten/ VLA-4-AK behandelten Tieren (VLA-4-AK) an Tag 49. Kontrolle: n = 20, VLA-4-AK: n = 19. $p < 0,05$ wurden als statistisch signifikant gewertet. **: $p < 0,01$

4.2.6.3 Bestimmung des Fractional Shortening (FS)

Ein weiterer Parameter zur Beurteilung der kardialen Funktion ist das Fractional Shortening (FS). Es ist definiert als die prozentuale Veränderung des linksventrikulären Fassungsvermögens während einer Herzaktion [132]. Auch hier bewirkt die Blockade von VLA-4 ein deutlich besseres Ergebnis. Die mit VLA-4-Antikörper behandelten Tiere zeigten im Vergleich zu den unbehandelten Kontrolltieren ein signifikant höheres FS ($34,9 \pm 3,2$ % vs. $30,7 \pm 4,3$ %, $p = 0,003$, Abb. 32).

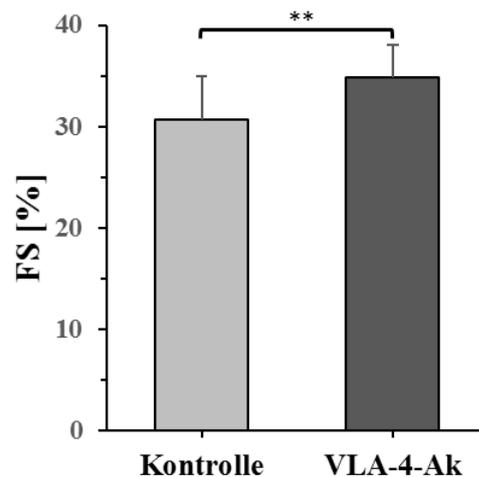


Abbildung 32: Vergleich des FS nach VLA-4-Antikörpertherapie

Vergleich der FS bei immunisierten/ unbehandelten Kontrolltieren (Kontrolle) verglichen mit immunisierten/ VLA-4-AK behandelten Tieren (VLA-4-AK) an Tag 49. Kontrolle: n = 18, VLA-4-AK: n = 18. $p < 0,05$ wurden als statistisch signifikant gewertet. **: $p < 0,01$

4.2.6.4 Bestimmung des Stroke Volume Index (SVI)

Das Stroke Volume bzw. Schlagvolumen ist die Differenz aus enddiastolischen und endsystolischen Volumen, beschreibt somit das Blutvolumen, das während der Systole aus dem linken Ventrikel ausgeworfen wird. Beim Stroke Volume Index wird dieses Volumen auf das Körpergewicht der Maus bezogen. Auch im Hinblick auf diesen Parameter führt die Blockade von VLA-4 zu einer verbesserten kardialen Funktion. Die mit VLA-4-Antikörper behandelten Mäuse zeigen im Vergleich zu den unbehandelten Kontrolltieren einen signifikant höheren SVI ($1,8 \pm 0,3 \mu\text{l/g}$ vs. $1,6 \pm 0,2 \mu\text{l/g}$, $p = 0,009$, Abb. 33).

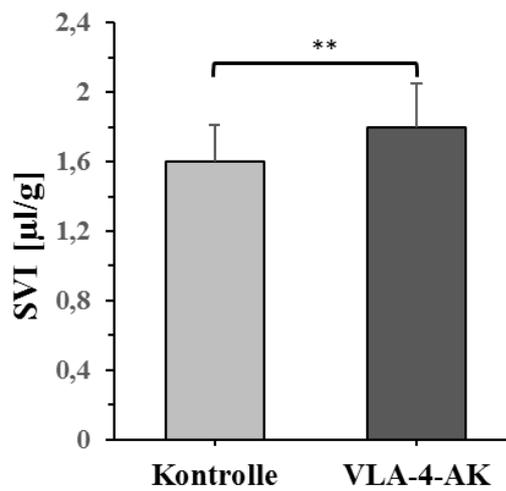


Abbildung 33: Vergleich des FS nach VLA-4-Antikörpertherapie

Vergleich des SVI bei immunisierten/ unbehandelten Kontrolltieren (Kontrolle) verglichen mit immunisierten/ VLA-4-AK behandelten Tieren (VLA-4-AK) an Tag 49. Kontrolle: $n = 20$, VLA-4-AK: $n = 19$. $p < 0,05$ wurden als statistisch signifikant gewertet. **: $p < 0,01$

4.2.7 Bestimmung der kardialen Fibrosierung an Tag 49 nach VLA-4-Antikörpertherapie

Anhand der Echokardiographie konnten wir zeigen, dass die Mäuse während des chronischen Verlaufs der EAM eine deutliche Einschränkung der kardialen Funktion mit einer Größenzunahme des linken Ventrikels entwickeln, was den Kriterien einer iDCM entspricht. Desweiteren konnte gezeigt werden, dass sich die Blockade von VLA-4 positiv auf die kardiale Funktion auswirkt. Um zu beurteilen, ob sich diese Verbesserung auch im histologischen Korrelat der iDCM, der kardialen Fibrosierung widerspiegelt, wurden die Herzen der Versuchstiere nach Durchführung der Echokardiographie wie unter 3.3.6.1 beschrieben entnommen und aufbereitet. Anhand von Masson-Trichrom gefärbten Herzschnitten und einem morphometrischen Verfahren wurde sowohl der prozentuale Fibroseanteil am gesamten Myokard als auch das Fibrosevolumen bestimmt.

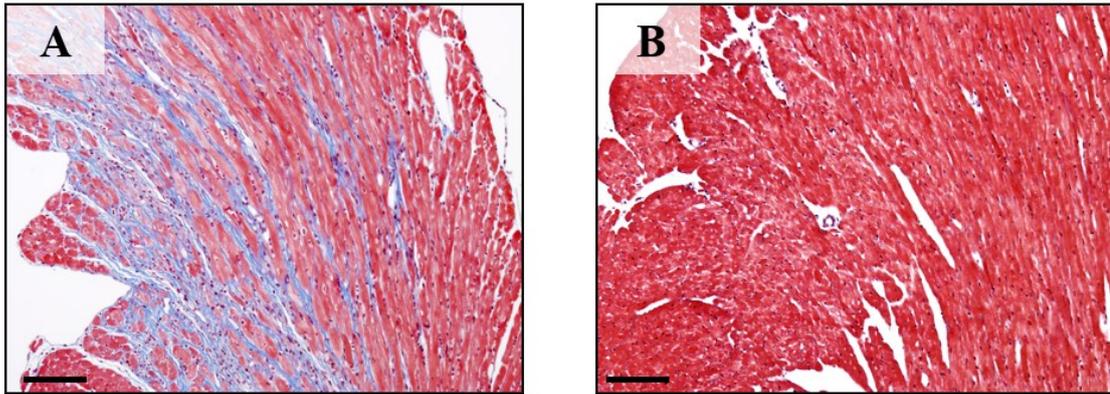


Abbildung 34: Darstellung der kardialen Fibrose anhand histologischer Schnitte des linken Ventrikels

Darstellung repräsentativer Querschnitte von Mäuseherzen an Tag 49 nach Induktion der EAM. Zu sehen ist sowohl ein Präparat eines immunisierten, ungeschulten Kontrolltieres (A) mit deutlicher kardialer Fibrose, sowie ein Präparat eines mit VLA-4-Antikörper behandeltem Tier mit deutlich geringerer kardialer Fibrose (B). Paraffinschnitt, Masson-Trichrom-Färbung. Referenzbalken entsprechen 100 μm .

Die Herzen der Tiere, die im akuten Krankheitsstadium mit dem VLA-4-Antikörper behandelt wurden, wiesen im Vergleich zu den ungeschulten Kontrolltieren einen deutlichen Trend hinsichtlich einer Reduktion des prozentualen Fibroseanteils auf, allerdings war der Unterschied nicht signifikant. Dabei lag der durchschnittliche Fibroseanteil nach VLA-4-Antikörpertherapie bei $0,86 \pm 1,00$ %, bei den ungeschulten Kontrolltieren bei $1,44 \pm 1,01$ % ($p = 0,058$, Abb. 35A). Ebenso verhielt es sich mit dem berechneten Fibrosevolumen. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen mit VLA-4-Antikörper therapierten Mäusen und den ungeschulten Kontrolltieren festgestellt werden. Jedoch zeigte sich auch hier ein deutlicher Trend mit Verringerung des Fibrosevolumens nach Gabe des VLA-4-Antikörpers ($1,76 \pm 2,05$ mm^3 vs. $2,99 \pm 2,19$ mm^3 , $p = 0,064$, Abb. 35B). Die Abbildung 34 zeigt beispielhaft histologische Schnitte des linken Ventrikels nach Massom-Trichrom-Färbung. Hierbei ist eine deutlich geringer kardiale Fibrose nach VLA-4-Antikörper-Therapie zu sehen.

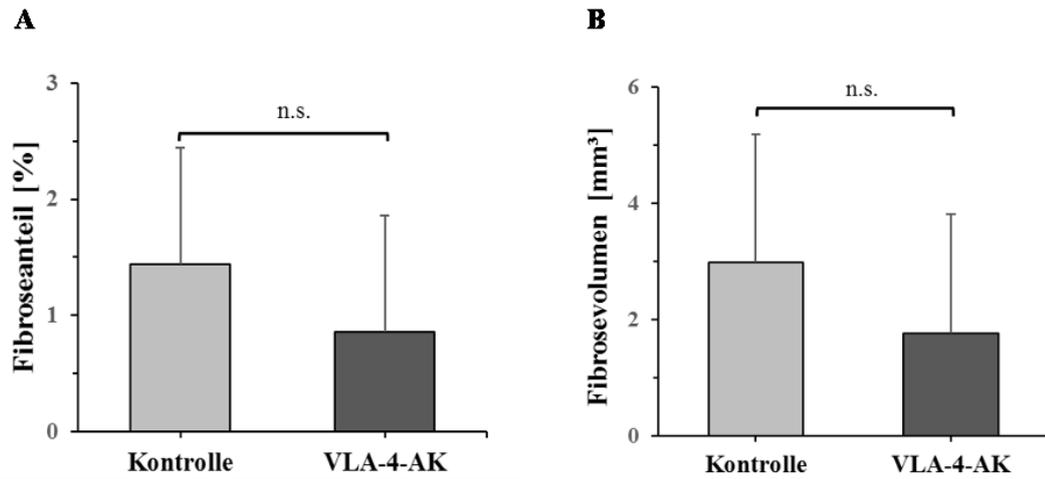


Abbildung 35: Vergleich der kardialen Fibrosierung nach VLA-4-Antikörpertherapie

Vergleich des myokardialen Fibroseanteils (A) und des Fibrosevolumens (B) von immunisierten/unbehandelten Kontrolltieren (Kontrolle) und immunisierten/ VLA-4-Antikörper behandelten Tieren (VLA-4-AK) an Tag 49. Bestimmung anhand der Morphometrie. Kontrolle: n = 19, VLA-4-AK: n = 19. $p < 0,05$ wurden als statistisch signifikant gewertet. n.s. = nicht signifikant.

5 DISKUSSION

Die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war, die Auswirkungen der Inhibition der VLA-4/VCAM-1- sowie der LFA-1/ICAM-1-Interaktion durch einen VLA-4- und LFA-1-Antikörper auf den Krankheitsverlauf der EAM zu untersuchen. Entsprechend unserer Hypothese sollte die Antikörpertherapie zu einer verringerten Einwanderung von Entzündungszellen in das Myokard führen und sich dadurch positiv auf das kardiale Remodeling sowie protektiv hinsichtlich der Entwicklung einer iDCM auswirken. Durch die Blockade von LFA-1 sollte zusätzlich eine eingeschränkte Aktivierung von T-Lymphozyten und damit eine reduzierte kardiale Inflammation erzielt werden.

Die wesentlichen Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

Blockade der LFA-1/ICAM-Interaktion:

Die Inhibition der LFA-1/ICAM-1-Interaktion ab Tag 14 der EAM führte weder zu einer Reduktion der entzündlichen kardialen Infiltrate noch der quantitativen Anzahl der infiltrierten Leukozytensubpopulationen im akuten Stadium der EAM.

Des Weiteren hatte die Blockade von LFA-1 ab Tag 14 der EAM keine Auswirkungen auf die Populationen der Th1-, Th2-, Th17- und T-regulatorischen Zellen in der Milz im akuten Stadium.

Inhibition der VLA-4/VCAM-1-Interaktion:

Durch die Inhibition der VLA-4/VCAM-1-Interaktion ab Tag 14 der EAM zeigte sich in den semiquantitativen histologischen Untersuchungen kein Unterschied in der Ausprägung der akuten entzündlichen kardialen Infiltrate an Tag 21 der EAM.

Jedoch konnte anhand der Durchflusszytometrie gezeigt werden, dass die Blockade von VLA-4 zu einer reduzierten Infiltration von Leukozyten und einiger Leukozytensubpopulationen während des akuten Stadiums führt. Dies hatte jedoch keinen Einfluss auf die Expression pro- sowie antiinflammatorischer Zytokine im Herzen zum Erkrankungshöhepunkt an Tag 21 der EAM.

Nach Inhibition der VLA-4/VCAM-1-Interaktion ab Tag 14 der EAM war die Anzahl der Th2-Zellen im Herzen an Tag 21 im Trend vermindert. Des Weiteren kam es zu einem signifikanten Anstieg der Th1-, Th2- und T-regulatorischen Zellen in der Milz.

Die VLA-4-Antikörpertherapie führte zu einer signifikanten Verbesserung der kardialen Funktion im chronischen Stadium an Tag 49 der EAM.

Nach der Blockade von VLA-4 zeigte sich ein deutlicher Trend zu einer verminderten kardialen Fibrosierung im chronischen Stadium der EAM.

5.1 EAM als Modell der postinfektiösen Autoimmunmyokarditis und DCM

In der vorliegenden Arbeit wurde mit dem Tiermodell der experimentellen Autoimmunmyokarditis gearbeitet. Die EAM ist ein weltweit etabliertes Mausmodell zur Erforschung pathophysiologischer Mechanismen der Autoimmunmyokarditis und der häufig daraus resultierenden inflammatorischen DCM. Tiermodelle sind in der medizinischen Forschung unverzichtbar, da sie uns ermöglichen, Erkrankungen und die damit einhergehenden komplexen immunologischen Prozesse in einem Gesamtorganismus zu untersuchen. Auch wenn es um die Entwicklung neuer Therapieoptionen geht, sind zunächst Untersuchungen im Tiermodell unerlässlich [75].

Die häufigste Ursache der Myokarditis beim Menschen ist eine virale Infektion [3]. Sowohl die histopathologischen als auch immunologischen Eigenschaften der EAM ähneln dem postinfektiösen chronischen Stadium der CVB3-induzierten Myokarditis, welches durch die Entwicklung einer Autoimmunmyokarditis charakterisiert ist [13, 73]. Dass die Induktion der EAM mit kardialem Myosin erfolgt, welches das dominierende Autoantigen in der CVB3 induzierten Myokarditis darstellt, kommt sicherlich als entscheidender Grund dafür in Frage [72]. Folglich kann anhand der EAM der chronische Verlauf der virusinduzierten Myokarditis untersucht werden, ohne dass eine virale Infektion zugegen ist, was die Durchführung der Versuche erheblich erleichtert. Eine Schwachstelle des Modells ist jedoch, dass die Versuchstiere große Unterschiede in der Krankheitsausprägung aufweisen [5]. Auch bei vorangehenden Versuchen unserer Arbeitsgruppe entwickelten nicht alle immunisierten Tiere eine Myokarditis, beziehungsweise wiesen in der histologischen Untersuchung keine entzündlichen myokardialen Infiltrate auf [120]. Um die Erkrankungsinzidenz zu erhöhen, wurde in der vorliegenden Arbeit das Immunisierungsprotokoll überarbeitet. Dazu wurde neben CFA als zusätzliches Adjuvans Pertussistoxin verwendet. Bereits Smith et al. konnten dadurch die Myokarditisinzidenz von 75% (Immunisierung ohne Pertussistoxin) auf 96% (Immunisierung mit Pertussistoxin) erhöhen [82]. Auch im Tiermodell der experimentellen Autoimmunencephalitis ist die Verwendung von Pertussistoxin als Co-Adjuvans beschrieben, genauere Wirkmechanismen sind jedoch unklar [133, 134]. In der vorliegenden Arbeit konnten trotz Verwendung von Pertussistoxin weiterhin bei ca. 20 % der Versuchstiere keine entzündlichen myokardialen Infiltrate in der HE-Färbung an Tag 21 der EAM nachgewiesen werden. Für nachfolgende Arbeiten sollte daher das Immunisierungsprotokoll erneut überarbeitet werden.

5.2 Rolle der Inhibition der LFA-1/ICAM-1-Interaktion bei der EAM

Bei der EAM handelt es sich um eine T-Zell-vermittelte Autoimmunerkrankung. Sowohl für die Initiierung als auch für die Progression der Myokarditis spielen die T-Lymphozyten eine entscheidende Rolle [81]. Bereits Smith et al. konnten zeigen, dass durch den Transfer von T-Zellen eine akute Myokarditis bei SCID-Mäusen ausgelöst wird [82]. Diese T-Zellen waren zuvor Mäusen, die nach Immunisierung mit kardialem Myosin eine akute Myokarditis entwickelt hatten, entnommen worden [82]. Dieselbe Forschungsgruppe konnte außerdem feststellen, dass durch die antikörpervermittelte Depletion von CD4⁺ Zellen die Entstehung einer EAM bei A/J-Mäusen verhindert werden konnte. Das Fehlen von CD8⁺ Zellen dagegen führte lediglich zu einer verminderten Krankheitsausprägung [82]. Sowohl in immunohistochemischen Untersuchungen als auch in FACS-Analysen des entzündlichen myokardialen Infiltrates bei der akuten EAM sind deutlich mehr CD4⁺ Zellen als CD8⁺ Zellen nachweisbar [81]. Somit stellt die Migration von CD4⁺ T-Zellen in das Herz einen entscheidenden Schritt in der Entstehung der EAM dar.

Wie bereits unter 1.3.2 beschrieben, spielt die Interaktion zwischen LFA-1 und seinem Bindungspartner ICAM-1 eine entscheidende Rolle in der Aktivierung und Migration von T-Lymphozyten [99]. Daher wurde die Blockade von LFA-1 als möglicher therapeutischer Ansatz von verschiedenen Autoimmunerkrankungen untersucht. Bei Psoriasis handelt es wie bei der EAM um eine T-Zell-vermittelte Autoimmunerkrankung, die unter anderem durch eine Akkumulation von aktivierten T-Zellen in der Dermis und Epidermis charakterisiert ist [114]. Die Behandlung von Psoriasis-Patienten mit dem Antikörper Efalizumab, der gegen die CD11a-Untereinheit von LFA-1 gerichtet ist, führte zu einer deutlich verringerten Ansammlung von T-Zellen in Epidermis und Dermis von Psoriasis-Hautläsionen und damit auch zu einer signifikanten klinischen Verbesserung [114, 135]. Auch beim Modell der EAE kam es in Folge einer LFA-1-Antikörpertherapie zu einer geringeren Zellinfiltration des ZNS [113].

In der vorliegenden Arbeit wurden erstmals die Auswirkungen der LFA-1-Blockade durch einen monoklonalen Antikörper auf den Verlauf der EAM untersucht. Dazu wurde zunächst der Myokarditis-Schwergrad anhand der Histologie und des semiquantitativen EAM-Scores an Tag 21 evaluiert. Die Blockade von LFA-1 führte nicht zu einer Reduktion des EAM-Scores und damit auch nicht zu einer Reduktion der entzündlichen kardialen Infiltration (Abbildung 7). Dieses Ergebnis konnte in den durchflusszytometrischen Untersuchungen an Tag 21 reproduziert werden. Bei den mit LFA-1-Antikörper behandelten Tieren konnte weder eine quantitative Reduktion der CD45⁺ Zellen noch der einzelnen untersuchten Leukozytensubpopulationen (Abbildung 8-13) festgestellt werden. Folglich scheint die Infiltration von Leukozyten in das entzündete Myokard durch die Blockade von LFA-1 nicht verhindert zu werden. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass die Leukozytenmigration bei der

EAM über einen von der LFA-1/ICAM-1-Interaktion unabhängigen Mechanismus erfolgt. Möglicherweise ist aber auch der Start der Antikörperbehandlung mit Tag 14 zu spät gewählt, um die leukozytäre Infiltration in das Myokard zu verhindern. Afanasyeva et al. konnten bei der EAM bereits an Tag 15 nach Immunisierung einen erhöhten Anteil an Leukozyten sowie auch an CD4⁺ Zellen im Herzen mittels Durchflusszytometrie nachweisen, welcher auch bis zum Krankheitshöhepunkt der EAM an Tag 21 nicht weiter anstieg [76]. Dies legt nahe, dass ein Großteil der inflammatorischen Zellinfiltration bereits vor Beginn unserer Antikörpertherapie an Tag 15 erfolgt sein könnte und die Blockade von LFA-1 in unserem Versuchsdesign daher keine ausreichende Wirkung mehr zeigt. Um dies genauer zu evaluieren, müsste die Versuchsreihe mit einem früher gewählten Behandlungszeitraum beispielsweise ab Tag 7 wiederholt werden.

Neben LFA-1 existieren noch andere Integrine, die an der Extravasation von Leukozyten beteiligt sind. Dazu gehört auch Mac-1, ein weiteres β 2-Integrin, das vorwiegend auf Monozyten, Makrophagen und neutrophilen Granulozyten exprimiert wird [92]. Durch die Interaktion mit seinem Liganden RAGE (receptor of advanced glycation endproducts) auf Endothelzellen trägt Mac-1 zur Rekrutierung von Leukozyten im Rahmen einer akuten Entzündungsreaktion bei [136]. Frommhold et al. konnten mithilfe der Intravitalmikroskopie des Musculus cremaster im Mausmodell für eine durch ein akutes Trauma ausgelöste Entzündung zeigen, dass die Leukozyteninfiltration bei ICAM-1- und RAGE-Knock-out Mäusen im Vergleich zu Tieren, bei denen lediglich eines der beiden Adhäsionsmoleküle ausgeschaltet war, deutlich vermindert war [137]. Dies macht eine überlappende Funktion der beiden β 2-Integrin-Liganden wahrscheinlich [137]. Somit könnte die Rolle der LFA-1/ICAM-1-Interaktion bei der Leukozytenmigration im Rahmen einer akuten Entzündung durch die Interaktion von Mac-1/RAGE übernommen werden. Ob sich dies auch auf die EAM übertragen lässt, bedarf jedoch weiterer Untersuchungen.

Die gleiche Arbeitsgruppe um David Frommhold stellte außerdem fest, dass das entzündliche Milieu und die damit verbundenen Stimuli entscheidend dazu beitragen, über welchen Mechanismus die Leukozytenadhäsion und -migration erfolgt. Eine Stimulation mit Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin (fMLP) zusätzlich zur traumatisch ausgelösten akuten Entzündung führte zu einer vermehrten Leukozytenadhäsion über die LFA-1/ICAM-1-Interaktion [138]. Nach einer Vorbehandlung mit TNF- α und anschließender Stimulation mit fMLP erfolgte die Leukozytenadhäsion über die Interaktion von Mac-1 und RAGE [138]. Auch Foy und Ley konnten zeigen, dass eine Stimulation mit TNF- α und fMLP zu einer erhöhten Leukozytenadhäsion führt, die unabhängig von der Interaktion zwischen LFA-1 und ICAM-1 ist [139].

Wie unter 1.3.2 beschrieben ist neben LFA-1 auch das Integrin VLA-4 an der Leukozytenmigration und besonders an der Migration von T-Lymphozyten entscheidend beteiligt. In vitro Untersuchungen lassen annehmen, dass die Rolle der beiden Integrine hinsichtlich der Leukozytenadhäsion und -migration redundant ist, lediglich bei der Transmigration von inaktivierten Lymphoblasten scheint LFA-1 eine dominierende Rolle einzunehmen [140]. Jedoch scheint es auch vom entsprechenden Organ abhängig zu sein, über welchen Mechanismus die T-Lymphozyten vorrangig in das Gewebe einwandern [99]. Während im Tiermodell der experimentellen Autoimmunität eine vermehrte Expression von ICAM-1 auf retinalen Zellen und LFA-1 auf aktivierten T-Zellen auftritt und folglich die Infiltration von T-Zellen primär über die Interaktion von LFA-1 und ICAM-1 erfolgt, scheinen im ZNS sowohl LFA-1 als auch VLA-4 an der Extravasation der T-Lymphozyten beteiligt zu sein [141, 142]. Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass bei der EAM eine erhöhte Expression von VCAM-1 im Herzen auftritt [143]. Möglicherweise hat VLA-4 bei der EAM eine dominierende Rolle über LFA-1, was eine Erklärung dafür sein könnte, dass die Blockade von LFA-1 die Leukozyteninfiltration in das Myokard nicht beeinflusst. Dazu wären Untersuchungen zur kardialen Expression von ICAM-1 und LFA-1 bei der EAM hilfreich.

Die Dominanz der einzelnen Integrine scheint nicht nur gewebespezifisch, sondern auch abhängig von der betreffenden T-Zellsubpopulation zu sein. So konnten Rothhammer et al. für die EAE zeigen, dass die Blockade von VLA-4 die Infiltration von Th1-Zellen in das ZNS, nicht jedoch von Th17-Zellen verhindert. Die Einwanderung der Th17-Zellen wurde dagegen durch die Gabe eines LFA-1-Antikörpers unterbunden [133]. Dies konnte jedoch in der vorliegenden Arbeit für die EAM nicht bestätigt werden. Nach Blockade von LFA-1 zeigte sich kein Unterschied in der quantitativen Menge der untersuchten CD4⁺-Zellsubpopulationen im Herzen, weder der Th1-, Th2- noch Th17-Zellen (Abbildung 113).

Da die Interaktion von ICAM-1 und LFA-1 eine entscheidende Rolle in der Aktivierung der T-Zellen spielt, lag die Vermutung nahe, dass sich die Blockade dieser Interaktion durch Gabe des LFA-1-Antikörpers auf die Aktivierung und Rekrutierung der CD4⁺ T-Helferzellen in der Milz auswirkt. Um dies zu untersuchen, wurde der Anteil der CD4⁺ T-Helferzellen in der Milz nach LFA-1-Antikörpertherapie mit Hilfe der Durchflusszytometrie an Tag 21 bestimmt. Es konnte jedoch kein Unterschied hinsichtlich des Anteils der Th1-, Th2-, oder Th17-Zellen nach Blockade von LFA-1 verglichen mit den unbehandelten Kontrolltieren festgestellt werden (Abbildung 14). Somit scheint die Inhibition der LFA-1/ICAM-1-Interaktion die T-Helferzellendifferenzierung in der Milz bei der EAM nicht zu beeinflussen. Gültner et al. dagegen konnten bei LFA-1-knock-out-Mäusen mit EAE sogar eine Zunahme an Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein spezifischen CD4⁺ Zellen in der Milz nachweisen und damit zeigen, dass LFA-1 eine Kontrollfunktion in der Bildung von Antigen-spezifischen T-Zellen hat [144].

Neben den Subpopulationen der T-Helferzellen wurde die Auswirkung der Blockade von LFA-1 auf die T-regulatorischen Zellen untersucht. Die T-regulatorischen Zellen spielen eine zentrale Rolle für die Aufrechterhaltung eines immunologischen Gleichgewichts und der Toleranz des Immunsystems gegenüber körpereigenem Gewebe [127]. Sie können die Aktivierung, Proliferation und Effektor-Funktionen von verschiedenen Immunzellen, unter anderem CD4⁺ und CD8⁺ Zellen, und somit auch die Entstehung von Autoimmunerkrankungen verhindern [127, 128]. Die Bedeutung der T-regulatorischen Zellen im Rahmen einer Myokarditis ist nicht eindeutig geklärt. Jedoch scheinen Mäuse, die eine geringere Menge an T-regulatorischen Zellen sowohl im Herzen als auch in der Milz aufweisen, anfälliger für die Entwicklung einer EAM zu sein [145]. Außerdem scheint der Anteil an CD4⁺ CD25⁺ Zellen invers mit dem Schweregrad der EAM zu korrelieren [81]. In der vorliegenden Arbeit hatte die Blockade von LFA-1 keinen Einfluss auf die Migration der T-regulatorischen Zellen in das Myokard (Abbildung 12), was wiederum die Vermutung nahelegt, dass auch diese Zellpopulation unabhängig von LFA-1 in das Herz einwandern kann. Auch bei der EAE scheint die Infiltration der T-regulatorischen Zellen in das ZNS unabhängig von LFA-1 zu erfolgen. Gültner et al. konnten keinen Unterschied zwischen LFA-1-knock-out Mäusen und Wildtyp-Mäusen hinsichtlich der in das ZNS eingewanderten T-regulatorischen Zellen feststellen [144]. Jedoch war der Anteil der T-regulatorischen Zellen in der Milz der LFA-1-knock-out Mäuse deutlich reduziert und diese Tiere entwickelten einen schwereren Verlauf der EAE mit vermehrter Infiltration von autoreaktiven CD4⁺Zellen in das ZNS [144]. Dies legt die Schlussfolgerung nahe, dass LFA-1 eine wichtige Rolle in der Rekrutierung der T-regulatorischen Zellen und damit der Kontrolle von Autoimmunerkrankungen spielt. Dies konnte für die EAM nicht festgestellt werden. In unserem Versuch hatte die LFA-1-Antikörpertherapie keinen Einfluss auf die Rekrutierung der regulatorischen T-Zellen in der Milz und den Krankheitsverlauf der EAM (Abbildung 14). Hierfür könnte jedoch der Behandlungszeitraum verantwortlich sein. Möglicherweise ist der Zeitpunkt des Therapiestarts mit Tag 14 nach Induktion der EAM zu spät gewählt, um in die Rekrutierung der T-regulatorischen Zellen in der Milz einzugreifen. In nachfolgenden Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe führte die Blockade von LFA-1 ab Tag 0 der EAM zu einer verstärkten akuten Entzündungsreaktion mit einer vermehrten Leukozyteninfiltration in das Myokard [146]. Ob dieser Effekt wie bei der EAE durch eine beeinträchtigte Rekrutierung der regulatorischen Zellen vermittelt wird, bleibt unklar und benötigt weitere Untersuchungen.

5.3 Rolle der Inhibition der VLA-4/VCAM-1-Interaktion bei der EAM

5.3.1 Auswirkungen der VLA-4-Antikörpertherapie auf das akute Stadium der EAM

Bei einigen autoentzündlichen Erkrankungen konnte durch die Inhibition der VLA-4/VCAM-1-Interaktion ein deutlich verbessertes Outcome erzielt werden [107, 110]. Mit dem Einsatz des VLA-4-Antikörpers Natalizumab bei der Multiplen Sklerose hat dieser neue Therapieansatz Einzug in die Klinik erhalten [104, 107]. Der positive Effekt des VLA-4-Antikörpers konnte darauf zurückgeführt werden, dass die Leukozyteninfiltration in das ZNS verhindert wird und somit die inflammatorischen Infiltrate im Gehirn deutlich abnehmen [119]. In vorangegangenen Arbeiten konnte unsere Arbeitsgruppe erstmals zeigen, dass die Blockade von VLA-4 einen positiven Effekt auf den Verlauf der EAM hat. Die Behandlung mit dem VLA-4-Antikörper an Tag 7 nach der ersten Immunisierung führte zu einer Reduktion der entzündlichen kardialen Infiltrate in den histologischen Untersuchungen an Tag 21 [120]. Auch ein späterer Behandlungszeitpunkt an Tag 21 führte zu einer Reduktion der inflammatorischen Infiltrate an Tag 49. Wie bei der EAE und Multiplen Sklerose scheint der Antikörper auch bei der EAM die Einwanderung von Entzündungszellen in das Herz zu verhindern, was mit FACS-Analysen belegt werden konnte [120].

In der vorliegenden Arbeit sollten diese Ergebnisse für einen neu gewählten Behandlungszeitpunkt verifiziert werden. Der Krankheitshöhepunkt der EAM liegt bekanntermaßen an Tag 21, jedoch ist bereits an Tag 14 bis 15 eine vermehrte Infiltration von Leukozyten und vor allem Monozyten in das Herz nachweisbar [76, 86]. Daher wurde für ein therapeutisches Setting Tag 14 als Behandlungsbeginn gewählt und die Analysen an Tag 21 durchgeführt.

Zunächst wurde der Schweregrad der akuten Myokarditis mithilfe des histologischen EAM-Scores erfasst. Im Gegensatz zu den bisherigen Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnte in der semiquantitativen histologischen Auswertung kein Unterschied in der Ausprägung der inflammatorischen Infiltrate zwischen mit VLA-4-Antikörper behandelten und unbehandelten Tieren festgestellt werden (Abbildung 15). Es muss jedoch angemerkt werden, dass die Ergebnisse eine sehr große Streubreite aufwiesen und das EAM-Scoring und damit die Krankheitsausprägung vor allem in der unbehandelten Gruppe sehr variierte, was die Bewertung des Ergebnisses erschwert. Als Ergänzung der Histologie wurde zur Quantifizierung der Leukozyteninfiltration eine FACS-Analyse der Herzen an Tag 21 durchgeführt. Im Gegensatz zu den Ergebnissen der histologischen Untersuchungen zeigte diese bei den mit VLA-4-Antikörper behandelten Tieren eine signifikante Reduktion der in das Herz eingewanderten Leukozyten im Vergleich zu den unbehandelten Kontrolltieren (Abbildung 16).

Um genauere Aussagen über die Zusammensetzung des entzündlichen Infiltrates treffen zu können, wurden die verschiedenen Leukozytensubpopulationen mittels Durchflusszytometrie analysiert. Bei der EAM machen die CD45⁺/CD11b⁺ Zellen, welche hauptsächlich aus Monozyten, Makrophagen und neutrophilen Granulozyten bestehen, den Großteil des entzündlichen Infiltrats aus [76, 92]. Wir konnten zeigen, dass die Migration dieser Zellpopulation in das Myokard durch die Blockade von VLA-4 reduziert wurde (Abbildung 17). Die in das Herz eingewanderten inflammatorischen Zellen und darunter vor allem die Monozyten und T-Zellen sind unter anderem durch die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen entscheidend an der Aufrechterhaltung der Entzündungsreaktion bei der EAM beteiligt [67]. Zu diesen proinflammatorischen Zytokinen gehören unter anderem TNF- α und IL-6 [75, 87, 89]. Eriksson et al. konnten durch die Induktion einer EAM bei IL-6-defizienten Mäusen zeigen, dass diese seltener eine Myokarditis entwickeln oder die Erkrankung weniger schwer ausgeprägt ist [89]. Aber auch TNF- α scheint entscheidend an der Entstehung der EAM beteiligt zu sein. In Versuchen von Smith et al. führte die Gabe von Anti-TNF- α -Antikörpern vor der Immunisierung der Tiere mit kardialem Myosin zu einer geringeren Ausprägung der Autoimmunmyokarditis [87]. Um zu untersuchen, ob sich die verminderte Infiltration von CD45⁺/CD11b⁺ Zellen auf die Produktion inflammatorischer Zytokine auswirkt, wurde die Zytokinexpression im Herzen mittels quantitativer Real-time RT-PCR an Tag 21 untersucht. Hier konnte kein Unterschied in der relativen Expression von IL-6 und TNF- α zwischen behandelten und unbehandelten Tieren festgestellt werden (Abbildung 25 A, B). Dies lässt sich möglicherweise dadurch erklären, dass nicht nur die infiltrierenden Entzündungszellen sondern auch die Kardiomyozyten selbst Zytokine produzieren [67]. Zwar führte die Blockade von VLA-4 zu einer reduzierten Zellinfiltration in das Herz, jedoch ist anzunehmen, dass in der Zeit zwischen der Induktion der EAM und dem Beginn der Antikörpertherapie bereits eine Migration von Myosin-spezifischen aktivierten T-Zellen in das Herz erfolgt ist und damit auch eine Entzündungsreaktion mit Stimulation der Kardiomyozyten und Zytokinproduktion ausgelöst wird.

Neben den CD45⁺/CD11b⁺ Zellen machen die CD4⁺ T-Zellen zwar nur einen kleineren Teil des entzündlichen Infiltrates aus, jedoch sind sie wie bereits unter 1.2.2 beschrieben die treibende Kraft bei der Entstehung der EAM [76, 81, 82]. Nach der Induktion der EAM mit kardialem Myosin und CFA werden α -MyCH spezifische CD4⁺-T-Zellen, die einer negativen Selektion im Thymus entkommen sind, durch dendritische Zellen aktiviert und infiltrieren das Myokard [147, 148]. Dabei tragen die einzelnen Subpopulationen der T-Helferzellen in unterschiedlichem Maße zur Entstehung und dem Verlauf der EAM bei. Verschiedene wissenschaftliche Arbeiten schreiben sowohl den Th1- als auch den Th17-Zellen eine dominierende Rolle in der EAM zu [83, 145, 149]. Daher sollte in der vorliegenden Arbeit die Auswirkungen der VLA-4-Antikörpertherapie auf diese Zellpopulationen untersucht werden.

Rothhammer et al. konnten beispielsweise für die EAE zeigen, dass die Migration von Th1-Zellen in das ZNS durch die Blockade von VLA-4 verhindert wurde [133]. Dies ließ sich jedoch nicht auf die EAM übertragen. In der vorliegenden Arbeit führte die Gabe des VLA-4-Antikörpers zu keiner Reduktion der Th1-Zellen im Herzen (Abbildung 22 A). Ebenso hatte die Antikörpertherapie keinen Einfluss auf die Expression von IFN- γ , dem klassischen Th1-Zytokin, im Herzen (Abbildung 25 C). IFN- γ scheint jedoch neben seiner proinflammatorischen Rolle auch eine protektive Wirkung bei der EAM zu haben [150-152]. Dabei konnten Eriksson et al. den protektiven Effekt von IFN- γ darauf zurückführen, dass IFN- γ durch die erhöhte Expression der NO-Synthase eine anhaltende T-Zell-Antwort und damit eine Persistenz der Myokarditis verhindert [150].

Die Th17-Zellen spielen in der Pathogenese von vielen Autoimmunerkrankungen eine wichtige Rolle [130]. Charakteristisch für diese Zellpopulation ist die Produktion von IL-17A, das als proinflammatorisches Zytokin zur Gewebeschädigung bei Autoimmunerkrankungen führt [130]. Baldeviano et al. konnten zeigen, dass es im akuten Stadium der EAM zu einer Infiltration von Th17-Zellen in das Herz kommt [83]. Des Weiteren konnte IL-17A mit der Produktion von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- α und IL-6 in Verbindung gebracht werden [83]. Die gleiche Arbeitsgruppe fand heraus, dass IL-17A für die Entstehung der EAM nicht entscheidend ist, jedoch eine bedeutende Rolle für das kardiale Remodeling und für die Entwicklung einer DCM mit eingeschränkter Herzfunktion spielt [83]. Auch bei Patienten mit iDCM konnte eine zunehmende Herzinsuffizienz mit einer erhöhten Menge an Th17-Zellen in Verbindung gebracht werden [153]. In der vorliegenden Arbeit ließ sich nach Blockade von VLA-4 keine Reduktion der in das Herz eingewanderten Th17-Zellen feststellen (Abbildung 22 C). Dies könnte darin begründet sein, dass wie bereits unter 5.2 diskutiert auch diese Zellsubpopulation über andere Zelladhäsionsproteine in das Herz einwandern kann und je nach Situation ihre Abhängigkeit von einem bestimmten Integrin verändern kann. Hierzu wären weiterführende Untersuchungen mit beispielsweise gleichzeitiger Blockade von VLA-4 und LFA-1 erforderlich.

Neben den Th1- und Th17-Zellen zählen auch die Th2-Zellen zu den CD4⁺ T-Helferzellen. Die Blockade von VLA-4 führte zu einer geringgradigen Reduktion der Th2-Zellen im Herzen an Tag 21, allerdings war das Ergebnis nicht signifikant (Abbildung 22 B). Die Expression von IL-4 und IL-10 war nach Gabe des VLA-4-Antikörpers jedoch nicht vermindert (Abbildung 25 E, F). Auch für diese Zellpopulation konnten einige Forschungsgruppen eine pathogenetische Relevanz für die EAM aufzeigen. In einer Arbeit von Marina Afanasyeva führte die Blockade von IL-4 zu einer geringeren Krankheitsausprägung der EAM [74]. Analog dazu konnten Barin et al. zeigen, dass IFN- γ - und IL-17A-knock-out Mäuse eine schwere Form der EAM entwickeln, die einen Th2-Phenotyp mit kardialer Infiltration durch eosinophile Granulozyten

aufweist [154]. Die Auswirkung der VLA-4-Antikörpertherapie auf die kardiale Infiltration von eosinophilen Granulozyten wurde in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht untersucht.

In der vorliegenden Arbeit wurde außerdem die Auswirkung der VLA-Antikörpertherapie auf die T-regulatorischen Zellen untersucht. Die Blockade von VLA-4 hatte keinen Einfluss auf die absolute Menge an T-regulatorischen Zellen im Herzen an Tag 21 (Abbildung 21). Jedoch führte die Inhibition der VLA-4/VCAM-1-Interaktion zu einer gesteigerten Rekrutierung von T-regulatorischen Zellen in der Milz (Abbildung 23). Bei der EAE konnte die absolute Menge der T-regulatorischen Zellen in der Milz, nicht jedoch die Menge der das ZNS infiltrierenden T-regulatorischen Zellen mit dem Schweregrad der EAE korreliert werden. Bei den kränkeren Tieren war der Anteil der T-regulatorischen Zellen in der Milz reduziert [144]. Ob sich dies auch auf die EAM übertragen lässt, ist jedoch nicht klar. Chen et al. konnten darlegen, dass Mausstämme, die nach Immunisierung mit kardialem Myosin eine EAM entwickeln, einen geringeren Anteil an T-regulatorischen Zellen im Herzen und in der Milz aufweisen als Mausstämme, bei denen durch die Induktion keine EAM ausgelöst werden kann [145]. Die gesteigerte Rekrutierung von T-regulatorischen Zellen in der Milz könnte ein Hinweis für den positiven Effekt der Blockade von VLA-4 auf die EAM sein.

Neben den T-regulatorischen Zellen wurde in der vorliegenden Arbeit auch die Auswirkung der VLA-4-Antikörpertherapie auf den Anteil der einzelnen T-Helferzellen in der Milz an Tag 21 der EAM untersucht. Hierbei zeigte sich nach Blockade von VLA-4 interessanterweise eine signifikante Zunahme sowohl der Th1- als auch der Th2-Zellen im Vergleich zu den unbehandelten Kontrolltieren (Abbildung 24 A, B). Jedoch konnte kein Unterschied in der relativen Expression von IFN- γ und IL-4 in der Milz zwischen mit VLA-4-Antikörper behandelten und unbehandelten Tieren festgestellt werden (Abbildung 26 A, B). Wie bereits beschrieben konnten Gültner et al. für die EAE zeigen, dass es unter Abwesenheit von LFA-1 zu einer Zunahme der CD4⁺ Zellen in der Milz kommt [144]. Bei der EAM konnte dieser Effekt der LFA-1-Blockade auf die CD4⁺ Subpopulationen in der Milz nicht bestätigt werden. Für VLA-4 ist dagegen bisher nicht bekannt, dass es eine Rolle in der Aktivierung und Rekrutierung der T-Zellen in der Milz spielt, so dass die Zunahme der Th1- und Th2-Zellen in der Milz nach Blockade von VLA-4 schwierig einzuordnen ist und weiterer Untersuchungen bedarf.

Abschließend lässt sich sagen, dass die Blockade von VLA-4 zum Zeitpunkt des Erkrankungsbeginns zu einer absoluten Reduktion der das Herz infiltrierenden Leukozyten und besonders der Gruppe der CD45⁺CD11b⁺ Zellen führt. Kontrovers ist jedoch, dass sich in den histologischen Untersuchungen keine Reduktion der entzündlichen Infiltrate nach Blockade von VLA-4 zeigte. Betrachtet man auch den positiven Effekt des VLA-4-Antikörper auf den chronischen Verlauf der EAM, ist eine Verzerrung der histologischen Ergebnisse durch die in

dieser Versuchsreihe auftretende geringe Krankheitsausprägung in der Gruppe der unbehandelten Kontrolltiere anzunehmen. Zur Bestätigung dieser These wäre eine Wiederholung dieser Versuchsreihe mit gegebenenfalls noch höheren Gruppengrößen notwendig.

5.3.2 Auswirkungen der VLA-4-Antikörpertherapie auf die kardiale Fibrosierung und die Entwicklung einer DCM

Das Voranschreiten einer akuten Myokarditis hin zur DCM ist mit histologischen Veränderungen des Myokards assoziiert [67]. Während das akute Stadium einer Myokarditis von ausgeprägten entzündlichen Infiltraten im Herzmuskel geprägt ist, sind die Kennzeichen der DCM die zunehmende kardiale Fibrosierung und Dilatation des linken Ventrikels [37, 67]. Auf der zellulären Ebene entspricht das kardiale Remodeling der Dysbalance von Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) und den Gewebsinhibitoren (TIMPs), welche normalerweise für die Homöostase der extrazellulären Matrix verantwortlich sind [67]. Dies führt zu einer Unterbrechung der normalen kardialen Strukturen, eine Akkumulation von Kollagen und den Kollagen-produzierenden Fibroblasten und damit letztendlich zur kardialen Fibrosierung [67, 155].

Für die iDCM werden zwei mögliche Hauptszenarios wie es zur Akkumulation von für die kardiale Fibrosierung verantwortlichen Myofibroblasten im Herzen kommt [156]. Einerseits können Entzündungszellen zu Myofibroblasten transformieren [156]. Wie bereits beschrieben konnten Kania et al. konnten für die EAM zeigen, dass im akuten Stadium der EAM aus dem Knochenmark stammende Progenitorzellen, die auf ihrer Oberfläche Prominin-1 exprimieren, in das Herz einwandern und unter dem Einfluss von TGF- β zu Fibroblasten differenzieren [90]. Diese Vorläuferzellen machen den Großteil der Fibroblasten im Herzen bei der DCM aus und sind somit die zelluläre Hauptquelle der kardialen Fibrose [67, 90]. In vorangehenden Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnte bereits gezeigt werden, dass die Blockade von VLA-4 zum Entzündungshöhepunkt an Tag 21 die Migration der Prominin-1+ Zellen in das Herz verhindert [120]. Auch die VLA-4-Antikörpertherapie an Tag 14 und 18 führte zu einer signifikanten Reduktion der Prominin-1+ Zellen an Tag 21 im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren (Abbildung 19). In der Folge konnte an Tag 49 nach Gabe des VLA-4-Antikörpers eine verminderte kardiale Fibrosierung festgestellt werden (Abbildung 35). Zwar war dieses Ergebnis statistisch nicht signifikant, jedoch war ein deutlicher Trend zu verzeichnen. Damit liegt die Schlussfolgerung nahe, dass sich die Blockade von VLA-4 durch die Hemmung der kardialen Infiltration von Prominin-1+ Zellen positiv auf das kardiale Remodeling und die Fibrosierung auswirken könnte.

Ein anderer Mechanismus der kardialen Fibrosierung wäre, dass die ins Herz eingewanderten Entzündungszellen durch die Produktion von Zytokinen kardiale Fibroblasten aktivieren [156]

Arbeiten zum kardialen Remodeling nach Ischämie konnten zeigen, dass die kardiale Fibrosierung von im Herzen angesiedelten Fibroblasten ausgeht [157, 158]. Auch für die EAM gibt es Daten von Wu et al, die besagen, dass bei der EAM für die Entwicklung einer DCM nicht die infiltrierenden hämatopoetischen Zellen sondern herzeigene Fibroblasten verantwortlich sind [159]. Wu et al. konnten außerdem zeigen, dass IL-17A durch die Interaktion mit kardialen Fibroblasten eine Schlüsselrolle in der Entwicklung einer iDCM spielt [159]. Dies bestätigt die vorangehenden Daten von Baldeviano, dass IL-17A für das kardiale Remodeling und die Entstehung einer DCM entscheidend ist [83]. IL-17A-knock-out Mäuse entwickelten nach Induktion der EAM eine deutlich geringer ausgeprägte kardiale Fibrosierung, was mit einer verminderten Aktivität der beiden Matrixmetalloproteinasen MMP-2 und MMP-9 sowie mit einer reduzierten Freisetzung von proinflammatorischen und profibrotischen Zytokinen wie IL-1 β , IL-6, TNF- α und TGF- β in Verbindung gebracht werden konnte [83]. Auch im Tiermodell für die Leberzirrhose und die idiopathische pulmonale Fibrose hatte IL-17A ähnliche profibrotische Effekte [160, 161]. In der vorliegenden Arbeit führte jedoch die Blockade von VLA-4 nicht zu einer reduzierten Expression von IL-17A an Tag 21 im Herzen verglichen mit den unbehandelten Kontrolltieren (Abbildung 25 G). Nachdem die VLA-Antikörpertherapie auch keinen Einfluss auf die Infiltration der Th17-Zellen in das Herz an Tag 21 hatte, war dieses Ergebnis zu erwarten. Somit kann der in der vorliegenden Arbeit nachgewiesenen Trend zur Reduktion der kardialen Fibrosierung nach Blockade von VLA-4 nicht auf eine verminderte Einwanderung von Th17-Zellen in das Herz und daraus folgende verminderte Expression von IL-17A im Herzen zurückgeführt werden.

5.3.3 Verbesserung der kardialen Funktion durch Blockade von VLA-4

Die iDCM ist vor allem aufgrund der zunehmenden Herzinsuffizienz ein bedrohliches Krankheitsbild [14]. Daher ist es entscheidend, dass neue Therapien nicht nur die akute Entzündungsreaktion hemmen, sondern auch einen Einfluss auf das kardiale Remodeling und den Erhalt der kardialen Funktion nehmen. Um zu beurteilen, ob der VLA-4-Antikörper im gewählten therapeutischen Setting die kardiale Funktion positiv beeinflusst, wurde die linksventrikuläre Funktion mittels Echokardiographie evaluiert. Die Echokardiographie hat einen wichtigen Stellenwert bei der Einschätzung der Herzfunktion in den verschiedenen Mausmodellen für kardiovaskuläre Erkrankungen [162]. Sie hat als nicht-invasive Untersuchung den Vorteil, dass serielle Messungen am selben Tier möglich sind.

Zunächst wurden serielle Untersuchungen an Tag 0 und Tag 49 bei den unbehandelten Tieren vorgenommen, um die Herzfunktionseinschränkung bei der EAM beurteilen zu können. Die immunisierten Mäuse wiesen an Tag 49 eine deutlich eingeschränkte kardiale Funktion auf, was sich in einer im Vergleich zu Tag 0 erheblich verminderten LVEF widerspiegelte (Abbildung 29). Somit konnten wir zeigen, dass unsere Tiere im chronischen Stadium der EAM eine

deutlich eingeschränkte Pumpfunktion am ehesten im Rahmen einer inflammatorischen Kardiomyopathie entwickelten [14]. Diese Daten passen zu den Ergebnissen von Marina Afanasyeva, die zeigen konnte, dass die Tiere mit EAM im chronischen Stadium eine eingeschränkte Pumpfunktion mit reduzierter EF aufwiesen [76]. Mirna et al., die serielle echokardiographische Untersuchungen bei Mäusen mit EAM durchführten, konnten an Tag 21 nach Induktion der EAM keine Einschränkung der linksventrikulären Funktion feststellen [163]. Dies lässt darauf schließen, dass sich die Einschränkung der kardialen Funktion wie zu erwarten nicht im akuten Entzündungsstadium sondern erst im chronischen Stadium mit dem kardialen Remodeling entwickelt [76, 77]. Um die Auswirkungen der VLA-4-Antikörpertherapie auf die kardiale Funktion zu evaluieren, wurden die behandelten und unbehandelten Versuchstiere an Tag 49 mittels Kleintierechokardiographie untersucht. Wir konnten zeigen, dass die Blockade von VLA-4 zu einer Verbesserung der linksventrikulären Funktion im chronischen Stadium der EAM führte. Neben der LVEF wurden mit dem FS und dem SVI weitere Parameter zur Evaluation der kardialen Funktion erfasst [164]. Bei allen drei Parametern konnten wir eine signifikante Verbesserung bei den mit VLA-4-Antikörper behandelten Tieren feststellen (Abbildung 31-33).

Neben der Einschränkung der Herzfunktion kann mit Hilfe der Echokardiographie ein weiteres Merkmal der DCM beurteilt werden: die Dilatation des linken Ventrikels [67]. Wie erwartet kam es zwischen Tag 0 und Tag 49 bei den immunisierten Tieren zu einer signifikanten Zunahme sowohl des ESV als auch des EDV (Abbildung 27), welche als echokardiographische Parameter für die Ventrikeldilatation und das kardiale Remodeling gelten [131]. Somit konnten wir zeigen, dass die immunisierten Tiere im chronischen Stadium unseres Modells eine DCM zu entwickeln. Nachdem die Blockade von VLA-4 einen positiven Einfluss auf die linksventrikuläre Funktion hatte, war auch anzunehmen, dass die VLA-4-Antikörpertherapie zu einer verminderten Ventrikeldilatation führt. Dies konnte jedoch nicht bestätigt werden. Nach Gabe des VLA-4-Antikörpers ließ sich kein signifikanter Unterschied des ESV sowie des EDV im Vergleich zu den unbehandelten Kontrolltieren an Tag 49 feststellen. Jedoch zeigte sich ein deutlicher Trend hinsichtlich einer Reduktion des ESV (Abbildung 28).

Zusammenfassend führt die Blockade von VLA-4 im chronischen Stadium der EAM zur Verbesserung der kardialen Funktion. Auch ein positiver Effekt des VLA-4-Antikörpers auf das kardiale Remodeling ist anzunehmen, da die kardiale Fibrosierung im direkten Zusammenhang mit der kardialen Funktion steht. Bezüglich der kardialen Fibrosierung konnte zwar kein signifikanter Unterschied zwischen mit VLA-4-Antikörper behandelten und unbehandelten Tieren nachgewiesen werden, jedoch zeigte sich ein deutlicher Trend zur Reduzierung der kardialen Fibrosierung nach Gabe des VLA-4-Antikörpers. Wir gehen davon, dass die Blockade von VLA-4 über die reduzierte kardiale Infiltration von Prominin-1+-Zellen das kardiale Remodeling verhindert und damit zum Erhalt der kardialen Funktion führt.

5.4 Limitationen der Arbeit

Jede wissenschaftliche Arbeit, die auf ein Tiermodell zurückgreift, ist mit gewissen Limitationen konfrontiert. Tiermodelle bieten uns die Möglichkeit sowohl pathogenetische Abläufe als auch die Wirksamkeit neuer Therapieansätze *in vivo* zu untersuchen. Mit der EAM wurde ein Modell geschaffen, das uns ermöglicht, die komplexen immunologischen Vorgänge der postinfektiösen Autoimmunmyokarditis und der inflammatorischen dilatativen Kardiomyopathie zu erforschen, die *in vitro* nur unzureichend abgebildet werden könnten [71]. Jedoch weist das Modell gewisse Schwachstellen auf. Ein großer Nachteil des Modells ist die bereits erwähnte Varianz in der Krankheitsausprägung der immunisierten Tiere. Trotz der Überarbeitung des Immunisierungsprotokolls und der zusätzlichen Verwendung von Pertussistoxin zur Erhöhung der Myokarditisinzidenz bei den Versuchstieren, konnten weiterhin bei 20% der immunisierten Tiere an Tag 21 keine entzündlichen Infiltrate nachgewiesen werden, was folglich bedeutet, dass sie keine Myokarditis entwickelt haben. Durch diese weiterhin bestehende große Streubreite lässt sich möglicherweise erklären, warum nur ein Trend hinsichtlich einer Reduktion der kardialen Fibrosierung bei den mit dem VLA-4-Antikörper therapierten Tieren dargestellt werden konnte.

Um die Krankheitsausprägung der Tiere im akuten Stadium zu evaluieren, existieren bisher lediglich invasive Maßnahmen, die den Tod der Tiere bedingen [156]. Die Standarduntersuchung zur Erfassung des Myokarditisschweregrads stellt der histologische EAM-Score dar. Dies bedingt, dass keine weiteren Untersuchungen an den Versuchstieren mehr möglich sind. Der aus histologischen und durchflusszytometrischen Untersuchungen belegte Entzündungshöhepunkt an Tag 21 kann klinisch nicht verifiziert werden, denn die Versuchstiere weisen keine offensichtlichen klinischen Zeichen einer Herzinsuffizienz auf. In der Echokardiographie liegt keine Einschränkung der kardialen Funktion an Tag 21 vor [163]. Hilfreich wären nicht invasive, bildgebende Verfahren, die die entzündliche kardiale Infiltration sichtbar machen. Eine mögliche Option konnte die Fluor-19-basierte kardiale Magnetresonanztomographie sein, anhand derer selbst kleine inflammatorische Infiltrate im Myokard dargestellt werden können [156, 165].

Der in der vorliegenden Arbeit zur Blockade von LFA-1 eingesetzte Antikörper muM17 ist ein monoklonaler chimärer Maus/Ratte IgG-Antikörper, dessen Pharmakokinetik in der Maus bekannt ist [121]. Darauf basiert die Anwendung und Dosierung des Antikörpers in der vorliegenden Arbeit. Im Gegensatz dazu handelt es sich bei dem zur Blockade von VLA-4 eingesetzten Antikörper Natalizumab um einen humanisierten monoklonalen Antikörper, dessen pharmakokinetisches Verhalten in der Maus nicht bekannt ist [119]. Daher wäre eine erneute Versuchsreihe mit einem im Mausmodell erprobten Antikörper sinnvoll. Bei Studien im Tiermodell, bei denen die Wirksamkeit einer Antikörpertherapie untersucht wird, sind

unspezifische Interaktionen zwischen dem verabreichten Antikörper und dem Organismus möglich. Als Negativ-Kontrolle für diese unspezifischen Interaktionen ist die Verwendung eines Isotyp-Kontrollantikörpers in der Kontrollgruppe erforderlich [74, 83]. In der vorliegenden Arbeit dienten als Kontrollgruppe lediglich unbehandelte, immunisierte Tiere, was eine deutliche Limitation der Arbeit darstellt und in folgenden Untersuchungen verändert werden sollte.

Die bei der Induktion der EAM verwendeten Adjuvantien, CFA und Pertussistoxin, führen zu einer unspezifischen Aktivierung des Immunsystems [166]. Es ist anzunehmen, dass auch in anderen Organen als dem Herzen unspezifische entzündliche Reaktionen induziert werden, was die Ergebnisse beeinflussen könnte. Daher sollte bei weiterführenden Untersuchungen dem Versuchsaufbau eine weitere Kontrollgruppe, bei der die Immunisierung lediglich mit CFA und Pertussistoxin erfolgt, hinzugefügt werden.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Obwohl die medizinische Forschung in den vergangenen Jahren beträchtliche Fortschritte im Verständnis des Krankheitsbildes Myokarditis und ihrer Pathogenese erzielen konnte, hat sich in der Therapie der Myokarditis nur wenig verändert. Neuere Therapieansätze haben sich bisher kaum durchgesetzt. Trotz ihres häufig initial asymptomatischen Verlaufs und der daraus resultierenden zu seltenen Diagnosestellung, ist die Myokarditis eine sehr ernst zu nehmende Erkrankung. Sie ist eine der führenden Ursachen einer DCM, welche wiederum den häufigsten Grund für eine Herztransplantation darstellt.

Wie bei vielen entzündlichen Erkrankungen ist auch bei der Myokarditis die Infiltration von Leukozyten in das Herz Kennzeichen und Schlüsselmechanismus der akuten Entzündungsreaktion. Die eingewanderten Entzündungszellen führen zur Verstärkung und Aufrechterhaltung der Inflammation. Im Rahmen der persistierenden Entzündungsreaktion kommt es zum kardialen Remodeling mit zunehmender kardialer Fibrosierung und damit zur Entstehung einer DCM mit eingeschränkter Kontraktilität.

Bei der Migration der Leukozyten in das Myokard spielt die Interaktion der Zelladhäsionsproteine LFA-1/ICAM-1 sowie VLA-4/VCAM-1 eine entscheidende Rolle. Ziel dieser Arbeit war es, die Auswirkungen der Inhibition der LFA-1/ICAM-1- sowie VLA-4/VCAM-1-Interaktion im Mausmodell der experimentellen Autoimmunmyokarditis in einem therapeutischen Setting zu untersuchen und daraus gegebenenfalls neue Therapieoptionen für die Myokarditis und DCM abzuleiten.

Entgegen unserer Annahme hatte die Inhibition der LFA-1/ICAM-1-Interaktion durch den Einsatz eines monoklonalen LFA-1-Antikörpers keinen Einfluss auf die entzündliche Infiltration des Myokards. Es zeigte sich weder eine Reduktion der inflammatorischen Infiltrate noch eine Reduktion der absoluten Menge an eingewanderten Leukozyten oder der einzelnen Leukozytensubpopulationen.

Durch Inhibition der VLA-4/VCAM-1-Interaktion anhand einer VLA-4-Antikörpertherapie konnte in der Histologie keine Reduktion der entzündlichen kardialen Infiltrate im akuten Stadium der EAM erzielt werden. Kontrovers dazu führte die Blockade der VLA-4/VCAM-1-Interaktion zu einer signifikanten Abnahme der das Herz infiltrierte Leukozyten sowie der Subpopulation der CD45⁺/CD11b⁺ Zellen im akuten Stadium der EAM. Des Weiteren kam es zur reduzierten Einwanderung der Prominin⁺1-Progenitorzellen. Im chronischen Stadium führte die VLA-4-Antikörpertherapie zur Verbesserung der kardialen Funktion. Dies spiegelte sich auf histologischer Ebene in einem deutlichen Trend zur verringerten kardialen Fibrosierung wider.

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. Dennert, R., H.J. Crijns, and S. Heymans, *Acute viral myocarditis*. *Eur Heart J*, 2008. **29**(17): p. 2073-82.
3. Blauwet, L.A. and L.T. Cooper, *Myocarditis*. *Prog Cardiovasc Dis*, 2010. **52**(4): p. 274-88.
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. Cihakova, D. and N.R. Rose, *Pathogenesis of myocarditis and dilated cardiomyopathy*. *Adv Immunol*, 2008. **99**: p. 95-114.
6. Bracamonte-Baran, W. and D. Cihakova, *Cardiac Autoimmunity: Myocarditis*. *Adv Exp Med Biol*, 2017. **1003**: p. 187-221.
7. Doolan, A., N. Langlois, and C. Semsarian, *Causes of sudden cardiac death in young Australians*. *Med J Aust*, 2004. **180**(3): p. 110-2.
8. Fabre, A. and M.N. Sheppard, *Sudden adult death syndrome and other non-ischaemic causes of sudden cardiac death*. *Heart*, 2006. **92**(3): p. 316-20.
9. Maron, B.J., et al., *Eligibility and Disqualification Recommendations for Competitive Athletes With Cardiovascular Abnormalities: Task Force 2: Preparticipation Screening for Cardiovascular Disease in Competitive Athletes: A Scientific Statement From the American Heart Association and American College of Cardiology*. *Circulation*, 2015. **132**(22): p. e267-72.
10. Ammirati, E., et al., *Management of Acute Myocarditis and Chronic Inflammatory Cardiomyopathy: An Expert Consensus Document*. *Circ Heart Fail*, 2020. **13**(11): p. e007405.
11. D'Ambrosio, A., et al., *The fate of acute myocarditis between spontaneous improvement and evolution to dilated cardiomyopathy: a review*. *Heart*, 2001. **85**(5): p. 499-504.
12. Felker, G.M., et al., *Underlying causes and long-term survival in patients with initially unexplained cardiomyopathy*. *N Engl J Med*, 2000. **342**(15): p. 1077-84.

13. Leuschner, F., H.A. Katus, and Z. Kaya, *Autoimmune myocarditis: past, present and future*. J Autoimmun, 2009. **33**(3-4): p. 282-9.
14. 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.
15. Ammirati, E., et al., *Clinical Presentation and Outcome in a Contemporary Cohort of Patients With Acute Myocarditis: Multicenter Lombardy Registry*. Circulation, 2018. **138**(11): p. 1088-1099.
16. Tschöpe, C., et al., *Management of Myocarditis-Related Cardiomyopathy in Adults*. Circ Res, 2019. **124**(11): p. 1568-1583.
17. Schultheiss, H.P., U. Kuhl, and L.T. Cooper, *The management of myocarditis*. Eur Heart J, 2011. **32**(21): p. 2616-25.
18. Feldman, A.M. and D. McNamara, *Myocarditis*. N Engl J Med, 2000. **343**(19): p. 1388-98.
19. Bowles, N.E., et al., *Detection of Coxsackie-B-virus-specific RNA sequences in myocardial biopsy samples from patients with myocarditis and dilated cardiomyopathy*. Lancet, 1986. **1**(8490): p. 1120-3.
20. Pauschinger, M., et al., *Enteroviral RNA replication in the myocardium of patients with left ventricular dysfunction and clinically suspected myocarditis*. Circulation, 1999. **99**(7): p. 889-95.
21. Kuhl, U., et al., *High prevalence of viral genomes and multiple viral infections in the myocardium of adults with "idiopathic" left ventricular dysfunction*. Circulation, 2005. **111**(7): p. 887-93.
22. Pankuweit, S., et al., *Prevalence of the parvovirus B19 genome in endomyocardial biopsy specimens*. Hum Pathol, 2003. **34**(5): p. 497-503.
23. Kindermann, I., et al., *Update on myocarditis*. J Am Coll Cardiol, 2012. **59**(9): p. 779-92.
24. Punukollu, G., et al., *Clinical aspects of the Chagas' heart disease*. Int J Cardiol, 2007. **115**(3): p. 279-83.
25. Sagar, S., P.P. Liu, and L.T. Cooper, Jr., *Myocarditis*. Lancet, 2012. **379**(9817): p. 738-47.

26. 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.
27. Imanaka-Yoshida, K., *Inflammation in myocardial disease: From myocarditis to dilated cardiomyopathy.* Pathol Int, 2020. **70**(1): p. 1-11.
28. 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.
29. Mason, J.W., et al., *A clinical trial of immunosuppressive therapy for myocarditis. The Myocarditis Treatment Trial Investigators.* N Engl J Med, 1995. **333**(5): p. 269-75.
30. Hufnagel, G., et al., *The European Study of Epidemiology and Treatment of Cardiac Inflammatory Diseases (ESETCID). First epidemiological results.* Herz, 2000. **25**(3): p. 279-85.
31. Lauer, B., et al., *Cardiac troponin T in patients with clinically suspected myocarditis.* J Am Coll Cardiol, 1997. **30**(5): p. 1354-9.
32. 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.
33. Childs, H. and M.G. Friedrich, *Cardiovascular magnetic resonance imaging in myocarditis.* Prog Cardiovasc Dis, 2011. **54**(3): p. 266-75.
34. Friedrich, M.G., et al., *Cardiovascular magnetic resonance in myocarditis: A JACC White Paper.* J Am Coll Cardiol, 2009. **53**(17): p. 1475-87.
35. Abdel-Aty, H., et al., *Diagnostic performance of cardiovascular magnetic resonance in patients with suspected acute myocarditis: comparison of different approaches.* J Am Coll Cardiol, 2005. **45**(11): p. 1815-22.
36. Kindermann, I., et al., *Predictors of outcome in patients with suspected myocarditis.* Circulation, 2008. **118**(6): p. 639-48.
37. Aretz, H.T., *Myocarditis: the Dallas criteria.* Hum Pathol, 1987. **18**(6): p. 619-24.
38. 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.
39. 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.
40. 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. Endorsed by the Heart Failure Society of America and the Heart Failure Association of the European Society of Cardiology.* J Am Coll Cardiol, 2007. **50**(19): p. 1914-31.
 41. Fung, G., et al., *Myocarditis.* Circ Res, 2016. **118**(3): p. 496-514.
 42. 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.
 43. 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.
 44. Topkara, V.K., et al., *Ventricular assist device use for the treatment of acute viral myocarditis.* J Thorac Cardiovasc Surg, 2006. **131**(5): p. 1190-1.
 45. Kühl, 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.
 46. 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.
 47. 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.
 48. 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.
 49. 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.
 50. Frustaci, A., et al., *Immunosuppressive therapy for active lymphocytic myocarditis: virological and immunologic profile of responders versus nonresponders.* Circulation, 2003. **107**(6): p. 857-63.

51. Merken, J., et al., *Immunosuppressive Therapy Improves Both Short- and Long-Term Prognosis in Patients With Virus-Negative Nonfulminant Inflammatory Cardiomyopathy*. *Circ Heart Fail*, 2018. **11**(2): p. e004228.
52. McNamara, D.M., et al., *Controlled trial of intravenous immune globulin in recent-onset dilated cardiomyopathy*. *Circulation*, 2001. **103**(18): p. 2254-9.
53. Felix, S.B., et al., *Removal of cardiodepressant antibodies in dilated cardiomyopathy by immunoadsorption*. *J Am Coll Cardiol*, 2002. **39**(4): p. 646-52.
54. Felix, S.B., et al., *Hemodynamic effects of immunoadsorption and subsequent immunoglobulin substitution in dilated cardiomyopathy: three-month results from a randomized study*. *J Am Coll Cardiol*, 2000. **35**(6): p. 1590-8.
55. Mobini, R., et al., *Hemodynamic improvement and removal of autoantibodies against beta1-adrenergic receptor by immunoadsorption therapy in dilated cardiomyopathy*. *J Autoimmun*, 2003. **20**(4): p. 345-50.
56. Doesch, A.O., et al., *Effects of protein A immunoadsorption in patients with advanced chronic dilated cardiomyopathy*. *J Clin Apher*, 2009. **24**(4): p. 141-9.
57. Kawai, C., *From myocarditis to cardiomyopathy: mechanisms of inflammation and cell death: learning from the past for the future*. *Circulation*, 1999. **99**(8): p. 1091-100.
58. Liu, P.P. and M.A. Opavsky, *Viral myocarditis: receptors that bridge the cardiovascular with the immune system?* *Circ Res*, 2000. **86**(3): p. 253-4.
59. Elamm, C., D. Fairweather, and L.T. Cooper, *Republished: pathogenesis and diagnosis of myocarditis*. *Postgrad Med J*, 2012. **88**(1043): p. 539-44.
60. Liu, P.P. and J.W. Mason, *Advances in the understanding of myocarditis*. *Circulation*, 2001. **104**(9): p. 1076-82.
61. Rose, N.R., *Learning from myocarditis: mimicry, chaos and black holes*. *F1000Prime Rep*, 2014. **6**: p. 25.
62. Fairweather, D., et al., *From infection to autoimmunity*. *J Autoimmun*, 2001. **16**(3): p. 175-86.
63. Rose, N.R., et al., *Cardiac myosin and autoimmune myocarditis*. *Ciba Found Symp*, 1987. **129**: p. 3-24.
64. Caforio, A.L., et al., *Novel organ-specific circulating cardiac autoantibodies in dilated cardiomyopathy*. *J Am Coll Cardiol*, 1990. **15**(7): p. 1527-34.

65. Caforio, A.L., et al., *Circulating cardiac-specific autoantibodies as markers of autoimmunity in clinical and biopsy-proven myocarditis. The Myocarditis Treatment Trial Investigators.* Eur Heart J, 1997. **18**(2): p. 270-5.
66. 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.
67. Kania, G., P. Blyszczuk, and U. Eriksson, *Mechanisms of cardiac fibrosis in inflammatory heart disease.* Trends Cardiovasc Med, 2009. **19**(8): p. 247-52.
68. Fairweather, D., K.A. Stafford, and Y.K. Sung, *Update on coxsackievirus B3 myocarditis.* Curr Opin Rheumatol, 2012. **24**(4): p. 401-7.
69. Fairweather, D. and N.R. Rose, *Coxsackievirus-induced myocarditis in mice: a model of autoimmune disease for studying immunotoxicity.* Methods, 2007. **41**(1): p. 118-22.
70. Li, H.S., D.L. Ligon, and N.R. Rose, *Genetic complexity of autoimmune myocarditis.* Autoimmun Rev, 2008. **7**(3): p. 168-73.
71. Pummerer, C.L., et al., *Identification of cardiac myosin peptides capable of inducing autoimmune myocarditis in BALB/c mice.* J Clin Invest, 1996. **97**(9): p. 2057-62.
72. Neu, N., et al., *Autoantibodies specific for the cardiac myosin isoform are found in mice susceptible to Coxsackievirus B3-induced myocarditis.* J Immunol, 1987. **138**(8): p. 2488-92.
73. Neu, N., et al., *Cardiac myosin induces myocarditis in genetically predisposed mice.* J Immunol, 1987. **139**(11): p. 3630-6.
74. 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.
75. Blyszczuk, P., A. Valaperti, and U. Eriksson, *Future therapeutic strategies in inflammatory cardiomyopathy: insights from the experimental autoimmune myocarditis model.* Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets, 2008. **8**(4): p. 313-21.
76. 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.
77. Cihakova, D., et al., *Animal models for autoimmune myocarditis and autoimmune thyroiditis.* Methods Mol Med, 2004. **102**: p. 175-93.

78. Barin, J.G. and D. Čiháková, *Control of inflammatory heart disease by CD4+ T cells*. Ann N Y Acad Sci, 2013. **1285**: p. 80-96.
79. Rose, N.R. and S.L. Hill, *Autoimmune myocarditis*. Int J Cardiol, 1996. **54**(2): p. 171-5.
80. 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.
81. Afanasyeva, M., D. Georgakopoulos, and N.R. Rose, *Autoimmune myocarditis: cellular mediators of cardiac dysfunction*. Autoimmun Rev, 2004. **3**(7-8): p. 476-86.
82. Smith, S.C. and P.M. Allen, *Myosin-induced acute myocarditis is a T cell-mediated disease*. J Immunol, 1991. **147**(7): p. 2141-7.
83. 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. 1646-55.
84. Kaya, Z., et al., *Contribution of the innate immune system to autoimmune myocarditis: a role for complement*. Nat Immunol, 2001. **2**(8): p. 739-45.
85. Ong, S., et al., *Natural killer cells limit cardiac inflammation and fibrosis by halting eosinophil infiltration*. Am J Pathol, 2015. **185**(3): p. 847-61.
86. Barin, J.G., N.R. Rose, and D. Cihakova, *Macrophage diversity in cardiac inflammation: a review*. Immunobiology, 2012. **217**(5): p. 468-75.
87. Smith, S.C. and P.M. Allen, *Neutralization of endogenous tumor necrosis factor ameliorates the severity of myosin-induced myocarditis*. Circ Res, 1992. **70**(4): p. 856-63.
88. Rose, N.R., *Critical cytokine pathways to cardiac inflammation*. J Interferon Cytokine Res, 2011. **31**(10): p. 705-10.
89. 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.
90. 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.

91. 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.
92. Elangbam, C.S., C.W. Qualls, Jr., and R.R. Dahlgren, *Cell adhesion molecules--update*. Vet Pathol, 1997. **34**(1): p. 61-73.
93. Hynes, R.O., *Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion*. Cell, 1992. **69**(1): p. 11-25.
94. Frenette, P.S. and D.D. Wagner, *Adhesion molecules--Part I*. N Engl J Med, 1996. **334**(23): p. 1526-9.
95. Carlos, T.M., et al., *Vascular cell adhesion molecule-1 mediates lymphocyte adherence to cytokine-activated cultured human endothelial cells*. Blood, 1990. **76**(5): p. 965-70.
96. 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.
97. Anderson, M.E. and T.J. Siahaan, *Targeting ICAM-1/LFA-1 interaction for controlling autoimmune diseases: designing peptide and small molecule inhibitors*. Peptides, 2003. **24**(3): p. 487-501.
98. Frenette, P.S. and D.D. Wagner, *Adhesion molecules--Part II: Blood vessels and blood cells*. N Engl J Med, 1996. **335**(1): p. 43-5.
99. Walling, B.L. and M. Kim, *LFA-1 in T Cell Migration and Differentiation*. Front Immunol, 2018. **9**: p. 952.
100. Furuzawa-Carballeda, J. and J. Alcocer-Varela, *Interleukin-8, interleukin-10, intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 expression levels are higher in synovial tissue from patients with rheumatoid arthritis than in osteoarthritis*. Scand J Immunol, 1999. **50**(2): p. 215-22.
101. Seko, Y., et al., *Expression of intercellular adhesion molecule-1 in murine hearts with acute myocarditis caused by coxsackievirus B3*. J Clin Invest, 1993. **91**(4): p. 1327-36.
102. Seko, Y., et al., *Expression of vascular cell adhesion molecule-1 in murine hearts with acute myocarditis caused by coxsackievirus B3*. J Pathol, 1996. **180**(4): p. 450-4.
103. Seko, Y., et al., *Expression of major histocompatibility complex class I antigen in murine ventricular myocytes infected with Coxsackievirus B3*. Circ Res, 1990. **67**(2): p. 360-7.

104. Khoy, K., et al., *Natalizumab in Multiple Sclerosis Treatment: From Biological Effects to Immune Monitoring*. Front Immunol, 2020. **11**: p. 549842.
105. Stüve, O., et al., *alpha4-Integrin antagonism with natalizumab: effects and adverse effects*. J Neurol, 2008. **255 Suppl 6**: p. 58-65.
106. 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.
107. 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.
108. Rudick, R.A., et al., *Natalizumab plus interferon beta-1a for relapsing multiple sclerosis*. N Engl J Med, 2006. **354(9)**: p. 911-23.
109. Selewski, D.T., et al., *Natalizumab (Tysabri)*. AJNR Am J Neuroradiol, 2010. **31(9)**: p. 1588-90.
110. Ghosh, S., et al., *Natalizumab for active Crohn's disease*. N Engl J Med, 2003. **348(1)**: p. 24-32.
111. Sandborn, W.J., et al., *Natalizumab induction and maintenance therapy for Crohn's disease*. N Engl J Med, 2005. **353(18)**: p. 1912-25.
112. Targan, S.R., et al., *Natalizumab for the treatment of active Crohn's disease: results of the ENCORE Trial*. Gastroenterology, 2007. **132(5)**: p. 1672-83.
113. Kawai, K., et al., *Intrathecal administration of antibodies against LFA-1 and against ICAM-1 suppresses experimental allergic encephalomyelitis in rats*. Cell Immunol, 1996. **171(2)**: p. 262-8.
114. Gottlieb, A.B., et al., *Psoriasis as a model for T-cell-mediated disease: immunobiologic and clinical effects of treatment with multiple doses of efalizumab, an anti-CD11a antibody*. Arch Dermatol, 2002. **138(5)**: p. 591-600.
115. Gottlieb, A.B., et al., *Subcutaneously administered efalizumab (anti-CD11a) improves signs and symptoms of moderate to severe plaque psoriasis*. J Cutan Med Surg, 2003. **7(3)**: p. 198-207.
116. Ortonne, J.P., et al., *Impact of efalizumab on patient-reported outcomes in high-need psoriasis patients: results of the international, randomized, placebo-controlled Phase III Clinical Experience Acquired with Raptiva (CLEAR) trial [NCT00256139]*. BMC Dermatol, 2005. **5**: p. 13.
117. Molloy, E.S. and L.H. Calabrese, *Therapy: Targeted but not trouble-free: efalizumab and PML*. Nat Rev Rheumatol, 2009. **5(8)**: p. 418-9.

118. Bauer, M., et al., *Beta1 integrins differentially control extravasation of inflammatory cell subsets into the CNS during autoimmunity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(6): p. 1920-5.
119. Steinman, L., *Blocking adhesion molecules as therapy for multiple sclerosis: natalizumab*. Nat Rev Drug Discov, 2005. **4**(6): p. 510-8.
120. Becker, J., *Die Bedeutung der VCAM-1/VLA4-Achse im Rahmen der Autoimmunmyokarditis*, in *Medizinische Fakultät*. 2019, Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München
121. Clarke, J., et al., *Evaluation of a surrogate antibody for preclinical safety testing of an anti-CD11a monoclonal antibody*. Regul Toxicol Pharmacol, 2004. **40**(3): p. 219-26.
122. Wu, B., et al., *The application of mechanism-based PK/PD modeling in pharmacodynamic-based dose selection of muM17, a surrogate monoclonal antibody for efalizumab*. J Pharm Sci, 2006. **95**(6): p. 1258-68.
123. Baran, J., et al., *Three-color flow cytometry detection of intracellular cytokines in peripheral blood mononuclear cells: comparative analysis of phorbol myristate acetate-ionomycin and phytohemagglutinin stimulation*. Clin Diagn Lab Immunol, 2001. **8**(2): p. 303-13.
124. Lee, C.L., et al., *Immunobiological study of interferon-gamma-producing cells after staphylococcal enterotoxin B stimulation*. Immunology, 1990. **70**(1): p. 94-9.
125. Berg, J.M., J.L. Tymoczko, and L. Stryer, *Biochemie*. Vol. 5th. 2003: Spektrum Akademischer Verlag.
126. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. Methods, 2001. **25**(4): p. 402-8.
127. Sakaguchi, S., et al., *FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system*. Nat Rev Immunol, 2010. **10**(7): p. 490-500.
128. Sakaguchi, S., et al., *Regulatory T cells and immune tolerance*. Cell, 2008. **133**(5): p. 775-87.
129. Dardalhon, V., et al., *Role of Th1 and Th17 cells in organ-specific autoimmunity*. J Autoimmun, 2008. **31**(3): p. 252-6.
130. Bettelli, E., et al., *Induction and effector functions of T(H)17 cells*. Nature, 2008. **453**(7198): p. 1051-7.

131. Benavides-Vallve, C., et al., *New strategies for echocardiographic evaluation of left ventricular function in a mouse model of long-term myocardial infarction*. PLoS One, 2012. **7**(7): p. e41691.
132. Olson, L.E., et al., *Protection from doxorubicin-induced cardiac toxicity in mice with a null allele of carbonyl reductase 1*. Cancer Res, 2003. **63**(20): p. 6602-6.
133. 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.
134. Lando, Z. and A. Ben-Nun, *Experimental autoimmune encephalomyelitis mediated by T-cell line. II. Specific requirements and the role of pertussis vaccine for the in vitro activation of the cells and induction of disease*. Clin Immunol Immunopathol, 1984. **30**(2): p. 290-303.
135. Lebwohl, M., et al., *A novel targeted T-cell modulator, efalizumab, for plaque psoriasis*. N Engl J Med, 2003. **349**(21): p. 2004-13.
136. Chavakis, T., et al., *The pattern recognition receptor (RAGE) is a counterreceptor for leukocyte integrins: a novel pathway for inflammatory cell recruitment*. J Exp Med, 2003. **198**(10): p. 1507-15.
137. Frommhold, D., et al., *RAGE and ICAM-1 cooperate in mediating leukocyte recruitment during acute inflammation in vivo*. Blood, 2010. **116**(5): p. 841-9.
138. Frommhold, D., et al., *RAGE and ICAM-1 differentially control leukocyte recruitment during acute inflammation in a stimulus-dependent manner*. BMC Immunol, 2011. **12**: p. 56.
139. Foy, D.S. and K. Ley, *Intercellular adhesion molecule-1 is required for chemoattractant-induced leukocyte adhesion in resting, but not inflamed, venules in vivo*. Microvasc Res, 2000. **60**(3): p. 249-60.
140. Faveeuw, C., et al., *Roles of alpha(4) integrins/VCAM-1 and LFA-1/ICAM-1 in the binding and transendothelial migration of T lymphocytes and T lymphoblasts across high endothelial venules*. Int Immunol, 2000. **12**(3): p. 241-51.
141. Dewispelaere, R., et al., *ICAM-1 and VCAM-1 are differentially expressed on blood-retinal barrier cells during experimental autoimmune uveitis*. Exp Eye Res, 2015. **137**: p. 94-102.
142. Schläger, C., et al., *Effector T-cell trafficking between the leptomeninges and the cerebrospinal fluid*. Nature, 2016. **530**(7590): p. 349-53.
143. 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.

144. Gültner, S., et al., *Reduced Treg frequency in LFA-1-deficient mice allows enhanced T effector differentiation and pathology in EAE*. Eur J Immunol, 2010. **40**(12): p. 3403-12.
145. 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.
146. Weckbach, L.T., et al., *Blocking LFA-1 Aggravates Cardiac Inflammation in Experimental Autoimmune Myocarditis*. Cells, 2019. **8**(10).
147. Zarak-Crnkovic, M., et al., *Heart non-specific effector CD4(+) T cells protect from postinflammatory fibrosis and cardiac dysfunction in experimental autoimmune myocarditis*. Basic Res Cardiol, 2019. **115**(1): p. 6.
148. Lv, H., et al., *Impaired thymic tolerance to α -myosin directs autoimmunity to the heart in mice and humans*. J Clin Invest, 2011. **121**(4): p. 1561-73.
149. Heymans, S., et al., *The Quest for New Approaches in Myocarditis and Inflammatory Cardiomyopathy*. J Am Coll Cardiol, 2016. **68**(21): p. 2348-2364.
150. Eriksson, U., et al., *Lethal autoimmune myocarditis in interferon-gamma receptor-deficient mice: enhanced disease severity by impaired inducible nitric oxide synthase induction*. Circulation, 2001. **103**(1): p. 18-21.
151. Eriksson, U., et al., *Dual role of the IL-12/IFN-gamma axis in the development of autoimmune myocarditis: induction by IL-12 and protection by IFN-gamma*. J Immunol, 2001. **167**(9): p. 5464-9.
152. Rangachari, M., et al., *T-bet negatively regulates autoimmune myocarditis by suppressing local production of interleukin 17*. J Exp Med, 2006. **203**(8): p. 2009-19.
153. Myers, J.M., et al., *Cardiac myosin-Th17 responses promote heart failure in human myocarditis*. JCI Insight, 2016. **1**(9).
154. Barin, J.G., et al., *Fatal eosinophilic myocarditis develops in the absence of IFN- γ and IL-17A*. J Immunol, 2013. **191**(8): p. 4038-47.
155. D'Armiento, J., *Matrix metalloproteinase disruption of the extracellular matrix and cardiac dysfunction*. Trends Cardiovasc Med, 2002. **12**(3): p. 97-101.
156. Kania, G., et al., *Novel therapeutic options in inflammatory cardiomyopathy*. Swiss Med Wkly, 2013. **143**: p. w13841.
157. Yano, T., et al., *Intracardiac fibroblasts, but not bone marrow derived cells, are the origin of myofibroblasts in myocardial infarct repair*. Cardiovasc Pathol, 2005. **14**(5): p. 241-6.

158. Cucoranu, I., et al., *NAD(P)H oxidase 4 mediates transforming growth factor-beta1-induced differentiation of cardiac fibroblasts into myofibroblasts*. *Circ Res*, 2005. **97**(9): p. 900-7.
159. Wu, L., et al., *Cardiac fibroblasts mediate IL-17A-driven inflammatory dilated cardiomyopathy*. *J Exp Med*, 2014. **211**(7): p. 1449-64.
160. Lan, R.Y., et al., *Hepatic IL-17 responses in human and murine primary biliary cirrhosis*. *J Autoimmun*, 2009. **32**(1): p. 43-51.
161. Wilson, M.S., et al., *Bleomycin and IL-1beta-mediated pulmonary fibrosis is IL-17A dependent*. *J Exp Med*, 2010. **207**(3): p. 535-52.
162. Gao, S., et al., *Echocardiography in Mice*. *Curr Protoc Mouse Biol*, 2011. **1**: p. 71-83.
163. Mirna, M., et al., *Autoimmune myocarditis is not associated with left ventricular systolic dysfunction*. *Eur J Clin Invest*, 2019. **49**(8): p. e13132.
164. Yang, X.P., et al., *Echocardiographic assessment of cardiac function in conscious and anesthetized mice*. *Am J Physiol*, 1999. **277**(5): p. H1967-74.
165. van Heeswijk, R.B., et al., *Selective in vivo visualization of immune-cell infiltration in a mouse model of autoimmune myocarditis by fluorine-19 cardiac magnetic resonance*. *Circ Cardiovasc Imaging*, 2013. **6**(2): p. 277-84.
166. Root-Bernstein, R. and D. Fairweather, *Unresolved issues in theories of autoimmune disease using myocarditis as a framework*. *J Theor Biol*, 2015. **375**: p. 101-123.

8 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Pathogenese der viralen Myokarditis, modifiziert nach [3].....	9
Abbildung 2: Die Rolle von Adhäsionsmolekülen und deren Liganden bei der Migration von Leukozyten in entzündetes Gewebe, modifiziert nach [88].....	13
Abbildung 3: Das 2-Signal-Modell bei der T-Zell-Aktivierung, modifiziert nach [88].....	15
Abbildung 4: Zeitlicher Ablauf des Versuchsaufbaus	24
Abbildung 5: Bestimmung der kardialen Fibrosierung.....	32
Abbildung 6: Erfassung der kardialen Funktion mittels Echokardiographie	37
Abbildung 7: Darstellung des EAM-Scores nach LFA-1-Antikörpertherapie.....	39
Abbildung 8: Prozentualer Anteil der CD45+ Zellen im Herzen nach LFA-1-Antikörpertherapie	40
Abbildung 9: Prozentualer Anteil der CD45+/CD11b+ und CD45+/CD11b+/Gr-1+ Zellen im Herzen nach LFA-1-Antikörpertherapie	41
Abbildung 10: Prozentualer Anteil der CD45+/Prominin-1+ Zellen im Herzen nach LFA-1-Antikörpertherapie	42
Abbildung 11: Prozentualer Anteil der CD4+ Zellen im Herzen nach LFA-1-Antikörpertherapie	42
Abbildung 12: Prozentualer Anteil der T-regulatorischen Zellen im Herzen nach LFA-1-Antikörpertherapie	43
Abbildung 13: Prozentualer Anteil der Th-Zellpopulationen im Herzen nach LFA-1-Antikörpertherapie	44
Abbildung 14: Prozentualer Anteil der CD4+ Subpopulationen in der Milz nach LFA-1-Antikörpertherapie	45
Abbildung 15: Darstellung des EAM-Scores nach VLA-4-Antikörpertherapie.....	46
Abbildung 16: FACS-Analysen von CD45+ Zellen im Herzen nach VLA-4-Antikörpertherapie	48
Abbildung 17: FACS-Analysen der CD45+/CD11b+ Zellen im Herzen nach VLA-4-Antikörpertherapie	49
Abbildung 18: Prozentualer Anteil der CD45+/CD11b+/Gr-1+ Zellen im Herzen nach VLA-4-Antikörpertherapie.....	50
Abbildung 19: FACS-Analysen der CD45+/Prominin-1+ Zellen im Herzen nach VLA-4-Antikörpertherapie	51
Abbildung 20: Prozentualer Anteil der CD4+ Zellen im Herzen nach VLA-4-Antikörpertherapie	52
Abbildung 21: Prozentualer Anteil der T-regulatorischen Zellen im Herzen nach VLA-4-Antikörpertherapie	52

Abbildung 22: Prozentualer Anteil der Th-Subpopulationen im Herzen nach VLA-4-Antikörpertherapie	53
Abbildung 23: Prozentualer Anteil der T-regulatorischen Zellen in der Milz nach VLA-4-Antikörpertherapie	54
Abbildung 24: Prozentualer Anteil der Th-Subpopulationen in der Milz nach VLA-4-Antikörpertherapie	55
Abbildung 25: Relative Expression von Zytokinen im Herzen nach VLA-4-Antikörpertherapie	57
Abbildung 26: Relative Expression von Zytokinen in der Milz nach VLA-4-Antikörpertherapie	58
Abbildung 27: Zeitlicher Verlauf des ESV und EDV im Rahmen der EAM	59
Abbildung 28: Vergleich von ESV und EDV nach VLA-4-Antikörpertherapie	60
Abbildung 29: Zeitlicher Verlauf der LVEF im Rahmen der EAM	61
Abbildung 30: Bestimmung der kardialen Funktion an Tag 49 nach VLA-4-Antikörpertherapie anhand der Kleintierechokardiographie.....	61
Abbildung 31: Vergleich der LVEF nach VLA-4-Antikörpertherapie.....	62
Abbildung 32: Vergleich des FS nach VLA-4-Antikörpertherapie	62
Abbildung 33: Vergleich des FS nach VLA-4-Antikörpertherapie	63
Abbildung 34: Darstellung der kardialen Fibrose anhand histologischer Schnitte des linken Ventrikels.....	64
Abbildung 35: Vergleich der kardialen Fibrosierung nach VLA-4-Antikörpertherapie.....	65

9 TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Übersicht über die Ätiologie der Myokarditis, modifiziert nach [16].....	3
Tabelle 2: Tiermodelle für die Myokarditis, modifiziert nach [64]	11
Tabelle 3: Übersicht über Oberflächenmolekül-Antikörper, alle Angaben in μl	28
Tabelle 4: Übersicht über Intrazellulär-Antikörper, alle Angaben in μl	29
Tabelle 5: Übersicht über verwendete Primer.....	35

10 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ACE	Angiotensin Converting Enzym
APC	Antigenpräsentierende Zelle
α MyHC	α Myosin Heavy Chain
BSA	Bovines Serumalbumin
CAR	Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	komplementäre DNA
CFA	Complete Adjuvant Freund
CRP	C-reaktives Protein
CRT	Kardiale Resynchronisationstherapie
CVB3	Coxsackievirus 3
DCM	Dilatative Kardiomyopathie
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EAE	Experimentelle Autoimmunenzephalitis
EAM	Experimentelle Autoimmunmyokarditis
ECMO	Extrakorporalen Membranoxygenierung
EDV	Enddiastolisches Volumen
EKG	Elektrokardiogramm
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EF	Ejektionsfraktion
ESV	Endsystolisches Volumen
FACS	Fluorescence activated cell sorting (Durchflusszytometrie)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
fMLP	Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin
FS	Fractional Shortening
g	Gramm
HE	Hämatoxylin-Eosin
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
Hz	Hertz
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule 1
ICD	Implantierbarer Kardioverter-Defibrillator
iDCM	Inflammatorische dilatative Kardiomyopathie
IFN- γ	Interferon- γ
IgSF	Immunglobulinsuperfamilie
IL	Interleukin

i.p.	intraperitoneal
LFA-1	Leucocyte-function-antigen-1
Mac-1	Makrophagen-1-Antigen
mg	Miligramm
MHC	Major Histocompatibility Complex
min	Minute
ml	Mililiter
MMPs	Matrix-Metalloproteinasen
mRNA	messenger RNA
MRT	Magnetresonanztomographie
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NO	Stickstoffmonoxid
NYHA	New York Heart Association
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein
PMA	Phorbol-12-Myristat 13-Acetat
PML	Progressive multifokale Leukencephalopathie
PBS	Phosphat buffered saline
RAGE	receptor for advanced glycation endproducts
rpm	rounds per minute
s.c.	subkutan
SCID	Severe Combined Immunodeficiency
SVI	Stoke Volume Index
TGF- β	Transforming Growth Factor
TIMPs	tissue inhibitors of metalloproteinases
TLR	Toll-like-Rezeptoren
TNF- α	Tumornekrosefaktor
μ g	Mikroliter
μ l	Mikrogramm
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule-1
VLA-4	Very-late-antigen-4
WHO	World Health Organization
ZNS	Zentrales Nervensystem

11 DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die an der Entstehung meiner Dissertation beteiligt waren.

Diese Arbeit wurde im Rahmen des Promotionsstudiengangs Systembiologische Medizin, Förderprogramm für Forschung und Lehre, der LMU München erstellt. Daher möchte ich mich als aller erstes beim damaligen Leiter Herrn Prof. Dr. Dr. Heesemann für die Aufnahme in das FöFoLe-Programm bedanken.

Bei Herrn Prof. Dr. med. Wolfgang-Michael Franz und Herrn Prof. Dr. med. Stefan Brunner möchte ich mich für die Überlassung dieses spannenden Themas überlassen. Vor allem Herrn Prof. Dr. med. Stefan Brunner danke ich für die fortwährende Betreuung und Supervision und dass ich Teil seiner Arbeitsgruppe an der Medizinischen Klinik I des Klinikum Großhaderns sein durfte.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. med. Ulrich Grabmaier für seine gute und fachkundige Betreuung, sein unermüdliches Engagement sowie die vielen konstruktiven Gespräche und Ideen.

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich außerdem bei der technischen Assistentin der Arbeitsgruppe Frau Judith Arcifa für ihre tatkräftige Unterstützung bei der Vorbereitung und Durchführung von zahlreichen Versuchen aber auch besonders für die gute Zusammenarbeit und das freundschaftliche Arbeitsklima. Dabei möchte ich mich auch bei allen anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe insbesondere den anderen medizinischen sowie tierärztlichen Mitdoktoranden für die gute Zusammenarbeit und die gegenseitige Motivation bedanken.

Außerdem möchte ich mich auch bei den Mitarbeitern des Instituts für Tierpathologie der tierärztlichen Fakultät der LMU München insbesondere Frau PD Dr. med. vet. Nadja Herbach und Herrn Dr. med. vet. Andreas Blutke für die Kooperation zur Anleitung der Herstellung und Auswertung der histologischen Präparate bedanken. Besonders danke ich auch den technischen Assistentinnen Frau Lisa Pichl, Doris Merl sowie Michaela Nützel für die Anleitung und Unterstützung bei der Herstellung der histologischen Präparate.

Desweiteren gilt mein Dank auch Frau Prof. Dr. med. Gabriela Kania des Zentrums für Molekulare Kardiologie der Universität Zürich für die Erstellung des EAM-Scores.

Und schließlich möchte ich mich von ganzem Herzen bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken: meinen Eltern danke ich für ihre immerwährende und grenzenlose Unterstützung auf meinem bisherigen Lebensweg, durch die sie mir das Medizinstudium und damit auch diese

Promotion ermöglicht haben. Meinem Verlobten Markus danke ich für seine nie endende Geduld und Unterstützung – ohne ihn wäre diese Arbeit zuletzt nicht möglich gewesen.

12 EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

Julia Christina Ramsl, geb. Kreiner

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

Inhibition der Integrine VLA-4 und LFA-1 im Mausmodell der experimentellen 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.

Wasserburg, 28.12.2023

Julia Ramsl

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin

13 PUBLIKATIONSLISTE

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, 08/2016

Grabmaier U, Brandl L, Kreiner J, Negele T, Huber BC, Rimmbach C, David R, Brunner S.: *Increased numbers of bone marrow-derived cells in parathyroid adenoma*. *European Journal of Clinical Investigation* 09/2014

Grabmaier U, Theiss HD, Keithahn A, Gross L, Kreiner J, Brenner C, Huber B, von der Helm C, Klingel K, Franz WM, Brunner S.: *The role of 1.5 Tesla MRI and anesthetic regimen concerning cardiac analysis in mice with cardiomyopathy*. Plos One, 04/ 2014