

Die Bedeutung von Midkine im Mausmodell der experimentellen Autoimmunmyokarditis

von Andreas Uhl

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

Die Bedeutung von Midkine im Mausmodell der experimentellen Autoimmunmyokarditis

von Andreas Uhl

aus Schaffhausen

München 2017

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Molekulare Tierzucht und Biotechnologie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von: Univ.-Prof. Dr. Eckhard Wolf

Mitbetreuung durch: Priv.-Doz. Dr. Andreas Parzefall

Angefertigt im Forschungslabor B der Medizinischen Klinik und Poliklinik I des Klinikums
der Universität München, Campus Großhadern

Mentor: PD Dr. Stefan Brunner

**Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, PhD

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Eckhard Wolf

Korreferent/en: Priv.-Doz. Dr. Karin Weber

Tag der Promotion: 29.07.2017

Für Herrn Rauli

INHALTSVERZEICHNIS

I. EINLEITUNG.....	1
II. LITERATURÜBERSICHT	3
1. Myokarditis.....	3
1.1. Epidemiologie der Myokarditis.....	4
1.2. Pathophysiologie der Myokarditis	5
1.2.1. Akute Phase.....	6
1.2.2. Subakute Phase.....	7
1.2.3. Chronische Phase	7
1.3. Autoimmunmyokarditis	8
1.4. Myokarditis beim Tier.....	9
1.5. Myokarditis im Mausmodell	11
1.5.1. Coxsackievirus B3 (CVB3) - Infektion.....	11
1.5.2. Immunisierung mit kardialem Myosin.....	12
1.6. Zelluläres Infiltrat während der Myokarditis	14
2. Neutrophile Granulozyten (PMN).....	15
2.1. Neutrophil Extracellular Traps (NETs).....	15
2.1.1. NETs bei Erkrankungen.....	16
2.1.1.1. Mukoviszidose	17
2.1.1.2. Arterielle und venöse Thromben.....	17
2.1.1.3. Systemischer Lupus Erythematoses (SLE).....	18
2.1.1.4. Myokarditis	19
3. Midkine (MK).....	20
3.1. Protein und Gen.....	21
3.2. MK-Rezeptoren.....	22
3.3. MK bei Erkrankungen.....	25
3.3.1. Die Bedeutung von MK bei inflammatorischen Prozessen	25
3.3.1.1. Niere.....	26
3.3.1.2. Darm.....	27
3.3.1.3. Gelenke	28
3.3.1.4. Zentrales Nervensystem.....	29
3.3.1.5. Kreislaufsystem.....	31

4. Fragestellung dieser Arbeit	34
III. MATERIAL UND METHODEN.....	35
1. Versuchstiere	35
1.1. Verwendete Versuchstiere	35
1.2. Haltungsbedingungen.....	35
2. Material.....	36
2.1. Allgemeine Chemikalien, Lösungsmittel, Medien und Peptide.....	36
2.2. Immunisierung	37
2.3. Antikörper	37
2.4. Pharmaka.....	39
2.5. Färbungen.....	39
2.6. Operationszubehör	39
2.7. Materialien für Echokardiographie	40
2.8. Geräte und sonstige Materialien.....	40
2.9. Software	42
3. Methoden	43
3.1. Versuchsaufbau	43
3.2. Mausmodell.....	44
3.2.1. Komplikationen.....	45
3.2.2. Antikörperbehandlung.....	45
3.3. Histologie	45
3.3.1. Färbungen.....	46
3.3.1.1. Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	46
3.3.1.2. Immunhistochemie (IHC)	46
3.3.1.3. Masson-Trichrom-Färbung	46
3.3.2. Bestimmung des Leukozyteninfiltrationsgrades	47
3.3.3. Bestimmung muriner NET-positiver PMN <i>in vitro</i>	47
3.3.4. Bestimmung humaner NET-positiver PMN <i>in vitro</i>	49
3.3.5. Bestimmung der myokardialen Fibrose	51
3.4. Durchflusszytometrie (Fluorescence Activated Cell Sorting, FACS)	52
3.4.1. Prinzip der FACS-Analyse.....	52
3.4.1.1. MK-Blockade <i>in vitro</i>	54
3.4.1.2. Messung inflammatorischer Zellen in den Herzen	55

3.4.1.3. Messung von T-regulatorischen Zellen in der Milz.....	56
3.5. Echokardiographie	57
3.5.1. Prinzip der Echographie.....	57
3.5.2. Vorbereitung und Durchführung der Untersuchung.....	57
3.6. Statistische Analyse	59
IV. ERGEBNISSE.....	61
1. MK-Blockade.....	61
2. Ergebnisse der akuten Phase.....	62
2.1. Histologie (H&E).....	62
2.1.1. EAM-Score	62
2.1.2. Verhältnis Herz-/Körpergewicht.....	63
2.2. Durchflusszytometrie	64
2.2.1. FACS-Analyse des inflammatorisch veränderten Herzens.....	65
2.2.1.1. CD45+ Zellen.....	65
2.2.1.2. CD45+/CD11b+/Gr-1+ Zellen.....	66
2.2.1.3. CD45+/CD11b+/Gr-1- Zellen.....	67
2.2.1.4. CD4+ Zellen.....	68
2.2.2. FACS-Analyse Milz.....	69
2.2.2.1. T-regulatorische Zellen (Treg).....	69
2.3. NET-Formation	70
2.3.1. Immunfluoreszenz <i>in vitro</i>	70
2.3.1.1. NET-Formation muriner PMN.....	70
2.3.1.2. NET-Formation humaner PMN	72
3. Ergebnisse der chronischen Phase.....	74
3.1. Echokardiographie	74
3.1.1. Fractional Shortening (FS).....	75
3.1.2. Left Ventricular Ejection Fraction (LVEF).....	75
3.1.3. Stroke Volume Index (SVI)	75
3.2. Histologie	76
3.2.1. Bestimmung der myokardialen Fibrose	77
V. DISKUSSION	79
VI. ZUSAMMENFASSUNG.....	85

VII. SUMMARY	87
VIII. LITERATURVERZEICHNIS	89
IX. ANHANG.....	113
1. Abbildungsverzeichnis	113
2. Tabellenverzeichnis.....	114
X. DANKSAGUNG	115

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
ACK	Ammonium-Chlorid-Kalium
AHA	Anti-Herz-Autoantikörper
AK	Antikörper
ALK	Anaplastik Lymphoma Kinase
Anti-MK	Anti-Midkine-Antikörper
apoE	Apolipoprotein E
AV	Atrium-Ventrikel
α MyHC	α Myosin Heavy Chain
Ca ²⁺	Kalzium
CAR	Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CFA	Complete Freund's Adjuvant
CVB3	Coxsackievirus B3
Da	Dalton
DCM	Dilatative Kardiomyopathie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EAE	Experimentelle Autoimmun-enzephalomyelitis
EAM	Experimentelle Autoimmunmyokarditis
EKG	Elektrokardiogramm
EMB	Endomyokardiale Biopsie
EMT	Epithelial-mesenchymale Transmission
FS	<i>Fractional Shortening</i>
FSC	<i>Forward Scatter</i>
g	Gramm

g	Zentrifugalbeschleunigung
GHz	Gigahertz
Gr	Glukokortikoidrezeptor
h	Stunde
HLA	Humanes Leukocyten-Antigen
hMK	Humanes Midkine
hsMK	Humanes lösliches Midkine
HUVEC	Humane Umbilicalvenen-endothelzellen
H&E	Hämatoxylin Eosin
ICAM	Intercelluläres Adhäsionsmolekül
iDCM	Inflammatorische Kardiomyopathie
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IFN- γ	Interferon- γ
ip	<i>intraperitoneal</i>
Kd	Dissoziationskonstante
kDa	Kilodalton
KM	Knochenmark
kHz	Kilohertz
LPS	Lipopolysaccharid
LRP	<i>Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein</i>
LRPAP	<i>Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein Associated Protein</i>
LVEF	<i>Left Ventricular Ejection Fraction</i>
MCP-1	<i>Monocyte Chemotactic Protein</i>
mg	Milligramm
Mg ²⁺	Magnesium

MHC-II	<i>Major Histocompatibility Complex class II</i>
min	Minute
MIP-2	<i>Macrophage Inflammatory Protein</i>
MK	Midkine
MDK	Humanes Midkine-Gen
Mdk	Murines Midkine-Gen
Mdk ^{-/-}	Midkine defizient
mMK	Murines Midkine
ml	Milliliter
MM	Molare Masse
MOG	Myelin Oligodendrozyt Glykoprotein
MPO	Myeloperoxidase
MR	<i>Protein Molar Ratio</i>
mRNA	messenger RNA
MS	Multiple Sklerose
msMK	Murines lösliches Midkine
NE	Neutrophile Elastase
NET	<i>Neutrophil Extracellular Trap</i>
NGC	Neuroglycan C
nM	nanomolar
PAD	Peptidyl Arginine

	Deiminase
PFA	Paraformaldehyd
PMN	Polymorphkerniger Neutrophiler Granulozyt
PTN	Pleiotrophin
PTP ζ	<i>Receptor-like Protein Tyrosine Phosphatase Zeta</i>
PVB19	Parvovirus B19
RA	Rheumatische Arthritis
RF	Rheumafaktor
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
SLE	Systemischer Lupus Erythematoses
SPF	Spezifisch Pathogenfrei
SSC	Sideward Scatter
SVI	Stroke Volume Index
TLR	<i>Toll-Like-Receptor</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
Treg	T-regulatorische Zelle
WT	Wildtyp
ZNS	Zentrales Nervensystem
μ l	Mikroliter
μ g	Mikrogramm

I. EINLEITUNG

Die Myokarditis beschreibt eine entzündliche Erkrankung des Herzens, die oft junge Erwachsene betrifft. Für diese besteht aktuell keine spezifische Therapiemöglichkeit.

Der Heparin-bindende Wachstumsfaktor Midkine (MK) spielt während entzündlicher Prozesse eine entscheidende Rolle, indem er die Adhäsion von polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN) am Endothel fördern kann. Die Funktion von MK während der akuten Myokarditis sowie der daraus hervorgehenden inflammatorischen Dilatativen Kardiomyopathie (iDCM) ist jedoch bisher noch nicht erforscht.

In dieser Arbeit wurde mit Hilfe des Mausmodells zur *Experimentellen Autoimmunmyokarditis* (EAM) die Auswirkung einer Blockade von MK durch einen spezifischen MK-blockierenden Antikörper (anti-MK) sowohl auf die zelluläre Immunantwort als auch auf die weitere pathologische Entwicklung der Erkrankung untersucht. Hierfür wurden 6 - 8 Wochen alte BALB/c Mäuse mit dem T-Zell-Aktivator *Complete Freund's Adjuvant* (CFA) und dem herzspezifischen Peptid *α -Myosin Heavy Chain* (α MyHC) immunisiert.

An Tag 21, dem Höhepunkt der kardialen Inflammation, wurde nach Behandlung der Tiere mit anti-MK von Tag 0 an eine deutliche Reduktion der Leukozyteninfiltration in der H&E-Färbung am histologischen Präparat beobachtet. Durchflusszytometrisch zeigte sich nicht nur eine deutlich reduzierte Anzahl an Leukozyten (CD45+), sondern ebenfalls eine signifikante Reduktion der PMN (CD45+/CD11b+/Gr-1+) und T-Helferzellen (CD4+). Durch Immunhistochemie (IHC) konnte außerdem dargestellt werden, dass die Stimulation von PMN mit MK zur Formation von *Neutrophil Extracellular Traps* (NET) führt.

An Tag 63, dem chronischen Stadium des Modells, schützte die Blockade von MK die Tiere vor myokardialer Fibrose und der damit einhergehenden kardialen Dysfunktion.

Anti-MK verhinderte die Bindung von MK an isolierte Endothelzellen. Eine Blockade von MK hatte jedoch keine Auswirkungen auf T-regulatorische Zellen

aus der Milz.

Diese Arbeit zeigt, dass die Blockade von MK im EAM Modell nicht nur die Infiltration von Leukozyten und deren Subpopulationen maßgeblich beeinflussen kann, sondern auch die daraus resultierende pathologische Restrukturierung des Herzens reduziert.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Myokarditis

Myokarditis ist definiert als eine Entzündung mit Schädigung des Herzmuskelgewebes. Zum ersten Mal wurde die Myokarditis beim Menschen 1669 als pathologische Veränderung des Herzens erkannt (TAQUETI et al., 2006). Die Notwendigkeit eines besseren Verständnisses dieser Erkrankung wird u.a. dadurch deutlich, dass sie oft junge Menschen betrifft und sie daher bei Patienten unter 40 Jahre den Hauptgrund für Herzversagen darstellt (FELDMAN und MCNAMARA, 2000). Zwar heilt die akute Entzündung laut Studien bei bis zu 40% der Patienten spontan aus (DEC JR et al., 1985; SCHULTHEISS et al., 2011), bei Vorliegen eines histologisch positiven Befundes entwickeln jedoch bis zu 20% der Patienten eine Dilatative Kardiomyopathie (DCM) (FELDMAN und MCNAMARA, 2000; D'AMBROSIO et al., 2001). Die hohe Variabilität der klinischen Symptomatik und die damit einhergehend erschwerte Diagnosestellung stellen weitere Argumente zur Dringlichkeit des besseren Verständnisses dieser Pathologie dar. Die Symptome der Patienten reichen von Beschwerdefreiheit bis hin zum kardiogenen Schock. Laut einer Studie mit über 3000 Patienten klagten etwa 72% über Atemlosigkeit, 32% über Brustschmerzen und bei etwa 18% konnten Arrhythmien nachgewiesen werden (HUFNAGEL et al., 2000). In Nordamerika und Europa gelten virale Infektionen durch Adenoviren, Enteroviren, Influenzaviren, Parvoviren oder Herpesviren als bedeutendste Ursache der Myokarditis und der DCM (CAFORIO et al., 2007; KINDERMANN et al., 2008). Die Richtlinien zur Diagnostik der Myokarditis gehen aus den 1986 veröffentlichten „Dallas-Kriterien“ hervor. Diese definieren eine aktive Myokarditis durch entzündliches Infiltrat im Herzmuskel einhergehend mit Nekrose bzw. degenerativen Veränderungen der umliegenden Kardiomyozyten (ARETZ, 1986), sind jedoch aufgrund fehlender Sensitivität und der höheren diagnostischen und prognostischen Relevanz modernerer immunhistochemischer Verfahren mittlerweile von untergeordneter Bedeutung (BAUGHMAN, 2006). Als diagnostischer Goldstandard gelten die endokardiale Biopsie (EMB) und die immunhistologische Analyse, wobei > 14 Leukozyten/mm² (vorwiegend T-Helferzellen und Makrophagen) im Myokard und eine Überexpression von *Humanem Leukozyten Antigen* (HLA) Klasse-II nachgewiesen werden

(RICHARDSON et al., 1996; SCHULTHEISS und KÜHL, 2008; KINDERMANN et al., 2012). Interessanterweise scheinen jedoch weder die histopathologische Analyse nach den Dallas-Kriterien noch der Nachweis von Virusgenom im Herzgewebe eine verlässliche Aussage über die Prognose der betroffenen Patienten geben zu können. Im Gegensatz dazu konnte der immunhistologische Nachweis entzündlichem Infiltrats aus CD+ Zellen im Herzmuskelgewebe und eine Überexpression von MHC-II als unabhängiger Prädiktor identifiziert werden (KINDERMANN et al., 2008).

Tabelle 1: Übersicht der möglichen Ursachen für Myokarditis modifiziert nach (KINDERMANN et al., 2012)

<u>Klassifizierung</u>	<u>Untergruppen</u>	<u>Beispiele</u>
Infektiös	Bakterien	Chlamydien, Corynebakterien, Legionellen, Mykobakterien, Mykoplasmen, Staphylokokken, Streptokokken
	Pilze	Actinomyceten, Aspergillus, Kryptokokkus, Candida
	Viren	Adenoviren, Enteroviren, Herpesviren, Parvoviren
	Parasiten	Echinokokken, Trichinen
Autoimmunerkrankungen		Riesenzellmyokarditis, Morbus Crohn, Dermatomyositis, Rheuma, Sarkoidose
Allergische Reaktion	Antibiotika	Penicillin, Ampicillin
	Impfungen	Pockenimpfung, Tetanusimpfung
Vergiftung		Alkohol

1.1. Epidemiologie der Myokarditis

Die Myokarditis ist ein weltweit verbreitetes Krankheitsbild. Aufgrund der sehr stark unterschiedlich ausgeprägten Symptomatik ist es jedoch schwer, eine präzise

Prävalenz und Inzidenz der Erkrankung anzugeben. Aktuell wird die Prävalenz der Myokarditis auf etwa 22 pro 100.000 Patienten jährlich geschätzt (VOS et al., 2015). Grundsätzlich leiden junge Männer häufiger an einer Herzmuskelentzündung. Ältere Frauen hingegen, entwickeln häufig schwerere Verläufe bis hin zu lebensbedrohlichen Herzrhythmusstörungen und Herzversagen (FAIRWEATHER et al., 2013; KYTÖ et al., 2013).

Was den Auslöser der Erkrankung anbelangt, so scheint es jedoch unerwartete geographische Unterschiede zu geben. Während beispielsweise in Frankreich Enteroviren als allein verantwortlicher aktiver viraler Faktor der Myokarditis gelten (ANDRÉOLETTI et al., 2007), wurde mittels EMB in Deutschland regelmäßig und fast ausschließlich Parvovirus B19 (PVB19) und humanes Herpesvirus Typ 6 nachgewiesen (PANKUWEIT et al., 2003; PANKUWEIT et al., 2004; KÜHL et al., 2005b; TSCHÖPE et al., 2005; MAHRHOLDT et al., 2006). Diese Diskrepanz wird kontrovers diskutiert (YILMAZ et al., 2008). Hierbei könnten sowohl die unterschiedliche Ansteckungsgefahr mit entsprechenden viralen Erregern als auch die Unterschiede diagnostischer Verfahren eine entscheidende Rolle spielen (MASON JW, 2007). Neben viralen Auslösern kann die Myokarditis außerdem durch andere infektiöse Erreger, Hypersensibilitätsstörungen nach Arzneimittelgabe, bestimmte Impfungen oder Autoimmunerkrankungen ausgelöst werden (KINDERMANN et al., 2012). Man geht davon aus, dass die Myokarditis eine Grundlage für die spätere Entwicklung einer DCM darstellt. Grund zu dieser Annahme geben Daten aus Tiermodellen, das Vorhandensein von entzündlichem Infiltrat und persistierender viraler RNA bei EMB von DCM-Patienten. Ein weiteres Indiz für die direkte Abhängigkeit der DCM von der Myokarditis ist die Übereinstimmung vieler auslösender Faktoren beider Erkrankungen (MARON et al., 2006). Bis zu 21% der Patienten mit akuter Myokarditis entwickeln laut einer Follow-up-Studie über drei Jahre eine DCM (D'AMBROSIO et al., 2001). Zudem lässt sich bei ca. 30% aller DCM-Patienten eine chronische Myokarditis nachweisen (FRUSTACI et al., 2009).

1.2. Pathophysiologie der Myokarditis

Die Entstehung der Myokarditis beim Menschen wirft der Wissenschaft weiterhin Fragen auf und bleibt teilweise ungeklärt. Die wichtigsten Erkenntnisse über

pathophysiologische Vorgänge dieser meist viral verursachten Herzerkrankung wurden mit Hilfe von Mausmodellen erarbeitet, die sich beispielsweise mit der Infektion der Herzen mit Enteroviren wie dem Coxsackievirus B3 (CVB3) auseinandersetzen oder denen eine durch herzeigenes Myosin induzierte Myokarditis zu Grunde liegt. Der Verlauf der viralen Myokarditis kann in drei aufeinander folgende Phasen unterteilt werden (KAWAI, 1999b). Diese sind in Abbildung 1 schematisch dargestellt.

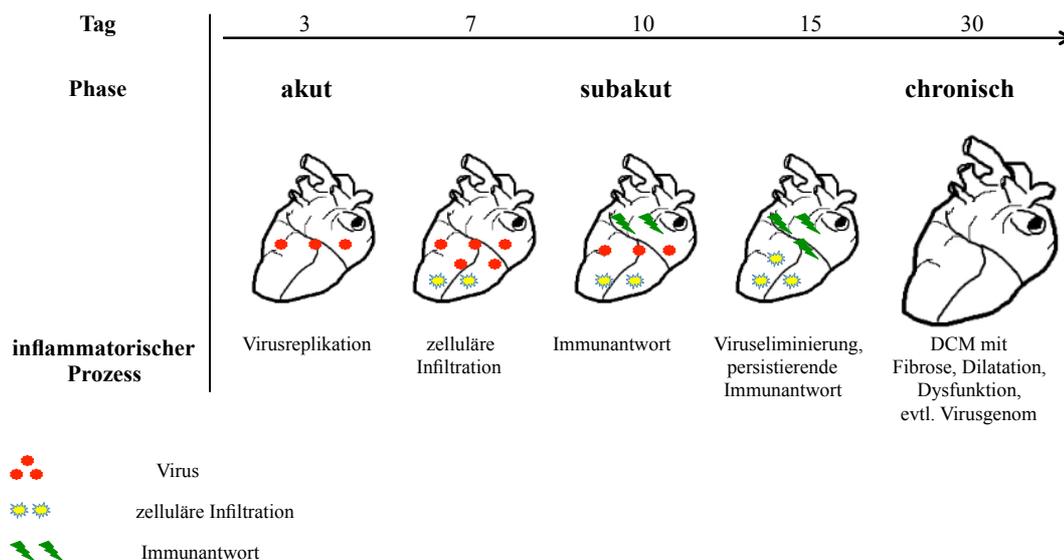


Abbildung 1: Schematische Darstellung des pathologischen Prozess während der virusbedingten Myokarditis modifiziert nach (KAWAI, 1999a)

Die akute Phase ist charakterisiert durch die Infektion und die darauf folgende Replikation des Virus. Nachdem das Virus in die Kardiomyozyten eingedrungen ist, erfolgt in der subakuten Phase eine Immunantwort des Organismus. Trotz Viruseliminierung kann es im weiteren chronischen Verlauf zu einer persistierenden Immunantwort und dauerhaften Schädigung des Herzens kommen.

1.2.1. Akute Phase

Die Infektion mit CVB3 stellt eine der häufigsten Ursachen für die akute Myokarditis beim Menschen dar (SHI et al., 2009). Die akute Phase der Myokarditis beginnt mit dem Eintritt der Viren in die Kardiomyozyten über den spezifischen Transmembranrezeptor Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor (CAR) und dauert in der Regel nur wenige Tage an. CAR ist der zelluläre Rezeptor für CVB3 und wird von unterschiedlichen Gewebearten, darunter Herz, Gehirn und Bauchspeicheldrüse, exprimiert (BERGELSON et al., 1997; TOMKO et al., 1997;

CHUNG et al., 2005). Nach der Internalisierung des Virus erfolgt die Replikationsphase, die mit der Lyse von Myozyten einhergeht und für die akute Phase der Erkrankung pathognomonisch ist (KLINGEL et al., 1992).

1.2.2. Subakute Phase

Die darauf folgende subakute Phase ist geprägt von humoralen und zellulären Abwehrprozessen und kann beim Menschen von wenigen Wochen bis hin zu mehreren Monaten andauern (KINDERMANN et al., 2012). Die Immunantwort wird hier u.a. durch die Zytolyse-bedingte Präsentation intrazellulärer Antigene der Myozyten, wie beispielsweise kardialen Myosin, ausgelöst und hat das Ziel, eine Eliminierung des Virus im Herzen zu erreichen. Hierbei kommt es zu einer Infiltration von Makrophagen sowie CD4+ und CD8+ T-Zellen in das Herzmuskelgewebe (KLINGEL et al., 1992). Die virusspezifische T-Zell-vermittelte Immunreaktion kann hier möglicherweise durch molekulare Mimikry zwischen Virusantigenen und herzeigenem Antigen den Grundstein für eine Autoimmunerkrankung bilden (GAUNTT et al., 1995; LI et al., 2006). In der subakuten Phase der Erkrankung kommt es weiterhin zur Aktivierung von B-Zellen und der Antikörperbildung gegen das ursächliche Virusantigen. Außerdem konnten *Klingel et al.* zeigen, dass auch freigesetzte Zytokine wie Interleukin (IL)-1, IL-6 oder Tumornekrosefaktor (TNF)- α sowie natürliche Killerzellen während der subakuten Phase der Myokarditis von Bedeutung sind (KLINGEL et al., 2014). Histologisch lässt sich während der subakuten Phase die Infiltration mononukleärer inflammatorischer Zellen in das Myokard beobachten (ARETZ, 1986).

1.2.3. Chronische Phase

Während die akute Phase nur wenige Tage andauert, kann sich die subakute und chronische Phase von wenigen Wochen bis hin zu mehreren Monaten ziehen (KINDERMANN et al., 2012). Bei bis zu 40% der Patienten kommt es nach der Viruseliminierung zu einer Regulierung der Immunantwort und dadurch auch zur Besserung der kardialen Funktion ohne merkliche Folgeschäden (SCHULTHEISS et al., 2011). Jedoch wird in Mausmodellen und vermutlich auch beim Menschen in einigen Fällen selbst nach vollständiger Viruseliminierung eine postinfektiös

anhaltende Immunreaktion beobachtet, die den Beginn der chronischen Phase definiert und zu pathologischer Restrukturierung des Myokards sowie zur Entwicklung einer DCM führen kann (LIU und MASON, 2001). Diese Immunreaktion ist häufig gegen organspezifische Antigene wie beispielsweise kardiales Myosin gerichtet und besitzt so einen autoimmunen Charakter.

1.3. Autoimmunmyokarditis

Es gibt eine Reihe von Hinweisen, dass die Myokarditis häufig einen autoimmunen Verlauf nimmt. So konnte beispielsweise bei einer Gruppe von Patienten eine Milderung der Erkrankung durch immunsuppressive Therapien erreicht werden, was einen indirekten Hinweis auf eine Autoimmunerkrankung gibt (KÜHL et al., 2005a; FRUSTACI et al., 2009; ESCHER et al., 2016). Auch die Tatsache, dass bei Patienten mit anderen Autoimmunerkrankungen, wie beispielsweise Lupus erythematodes, das Risiko zusätzlich an einer Myokarditis zu erkranken um 3 - 15 % erhöht ist, gibt Grund zur Annahme einer autoimmunen Entwicklung. Zusätzlich zeigen Patienten mit Lupus erythematodes im Verlauf ihrer Erkrankung oft eine Beteiligung des kardiovaskulären Systems, die sich in Form von Ergüssen oder Entzündungen des Perikards äußern kann (CIHAKOVA und ROSE, 2008). Den jedoch wohl wichtigsten Hinweis auf einen möglichen autoimmunen Verlauf der Myokarditis gibt die Anwesenheit von Autoantikörpern während der Pathogenese der Erkrankung. In den 1980er Jahren konnten zum ersten Mal herzspezifische Autoantikörper bei Cocksackievirus-induzierter Myokarditis im Mausmodell nachgewiesen werden (NEU et al., 1987b). Kurz darauf zeigten sich auch beim Menschen in 59% der Myokarditis- und DCM-Patienten freie Autoantikörper im Blut (NEUMANN et al., 1990). Des Weiteren konnten durch die Etablierung einer indirekten Immunfluoreszenz-Analyse organspezifische Anti-Herz-Autoantikörper (AHA) in etwa einem Drittel der Myokarditis- und DCM-Patienten bestätigt werden (CAFORIO et al., 2008). Diese Autoantikörper können gegen verschiedene Antigene gerichtet sein. Wie *Rose et al.* zeigen konnten, stellt kardiales Myosin eines dieser Antigene dar (ROSE et al., 1987), worauf in der Folge bei über 85% der Patienten mit DCM-Antikörper gegen kardiales Myosin nachgewiesen werden konnten (CAFORIO et al., 1992). Die Entstehung dieser AHAs könnte ihren Ursprung bereits in der subakuten Phase der Myokarditis haben. Hier kann es durch molekulare Mimikry

zwischen Virusantigen und kardialem Myosin im Zuge der T-Zell vermittelten Immunantwort und der Antikörperbildung von B-Zellen gegen das Virusantigen zur Immunreaktion gegen organspezifisches Antigen kommen (GAUNTT et al., 1995; LI et al., 2006). Autoantikörper sind jedoch nicht nur für die Pathogenese der Myokarditis, sondern auch bei anderen Herzerkrankungen von Bedeutung. Wie *Eriksson et al.* berichten, sind Autoantikörper gegen kardiales Troponin-1 in Patienten mit akutem Koronarsyndrom zu finden (ERIKSSON et al., 2005), während die Abwesenheit von Autoantikörpern gegen Troponin-1 bei Patienten nach Herzinfarkt mit einer Verbesserung der kardialen Funktion einhergehen kann (LEUSCHNER et al., 2008).

1.4. Myokarditis beim Tier

Auch bei Haustieren ist die Pathologie der Myokarditis durchaus bekannt. Ebenso wie beim Menschen hat sie ihren Ursprung in den meisten Fällen in einer systemischen Infektion durch Viren oder Bakterien (NELSON et al., 2014; BAUMGÄRTNER und GRUBER, 2015). Eine Übersicht der häufigsten Auslöser einer Herzmuskelentzündung beim Tier ist in Tabelle 2 aufgeführt.

Klinisch präsentiert sich die Myokarditis bei Tieren sehr variabel und äußert sich meistens durch eine verringerte Leistungsfähigkeit, die zunächst mit schnellem und kräftigem Puls einhergeht, im weiteren Verlauf jedoch in einer zunehmend schwächeren systolischen Pumpfunktion des Herzens resultiert (MORAILLON et al., 2009). Bei der Vorstellung in der Praxis zeigen betroffene Tiere im akuten Stadium häufig unerklärbare Arrhythmien oder Herzversagen. Eine kürzlich überstandene Infektionskrankheit kann hierbei erste Hinweise auf das Vorliegen einer Herzmuskelentzündung geben. Da es auch beim Tier keine eindeutig definierten klinischen Befunde gibt, ist eine definitive Diagnose der Erkrankung sehr schwierig. Unspezifische Veränderungen im EKG wie beispielsweise T- oder QRS-Veränderungen oder AV-Überleitungsstörungen können hierbei auf eine Herzmuskelentzündung hindeuten. Im Ultraschall sind weiterhin häufig schwache kardiale Funktion durch reduzierte Wandbewegung oder Perikarderguss zu diagnostizieren (NELSON et al., 2014).

Tabelle 2: Übersicht möglicher Auslöser der Myokarditis beim Tier

<u>Ursache</u>	<u>Tierart</u>	<u>Erreger</u>	<u>Pathologie</u>
Bakteriell	Hund	<i>Borellia burgdorferi</i>	nekrotisierend ; Infiltrat aus neutrophilen Granulozyten, Lymphozyten, Plasmazellen
	Pferd	<i>Actionbacillus equuli</i> , <i>Fusbacterium necrophorum</i>	septikämisch-eitrig ; Infiltrat aus neutrophilen Granulozyten, Lymphozyten, Plasmazellen
	Rind	<i>Histophilus somnus</i> , <i>Trueperella pyogenese</i>	
	Schwein	<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i> , <i>Streptococcus suis</i>	
Viral	Hund	<i>canines Parvovirus</i> ,	nekrotisierende Myokarditis , Myokarddegeneration,
		<i>canines Herpesvirus</i>	lymphohistozytäre Inflammation , intranukleäre Einschlusskörperchen
	Rind	Maul-und-Klauenseuche-Virus	multifokal-lymphozytär/nekrotisierend Charakteristisches Tigerherz
	Schwein	Enzephalomyocarditis-Virus	lymphohistozytäre Inflammation , Myokardnekrose
Mykotisch	Hund	<i>Aspergillus terreus</i>	nekrotisierend/granulomatöse Myokarditis
	Pferd		
Parasitär	Hund	<i>Neosporum caninum</i> ,	nekrotisierende Myokarditis
		<i>Toxoplasma gondii</i>	lymphozytäre Myokarditis
		<i>Trypanosoma cruzi</i>	Nekrose und Bruch der Myozyten ; mononukleäres Zellinfiltrat
	Katze	<i>Toxoplasma gondii</i>	lymphozytäre Myokarditis

Um eine Myokarditis am lebenden Organismus mit relativer Sicherheit eingrenzen zu können, ist ähnlich wie beim Menschen auch in der Tiermedizin die EMB das einzig verfügbare diagnostische Mittel. Hierbei wird analog zur humanmedizinischen Diagnostik inflammatorisches Infiltrat mit einhergehender Nekrose und/oder Degeneration der Kardiomyozyten beobachtet (ARETZ et al., 1987). Die Therapie einer Myokarditis beim Tier ist ebenso wenig spezifisch wie

deren Ursachen und Symptomatik. Daher wird empfohlen, die Erkrankung je nach vermuteter Ätiologie zu behandeln und weiterhin im Bedarfsfall einer Herzinsuffizienz oder Herzrhythmusstörungen medikamentös entgegenzuwirken (MORAILLON et al., 2009).

1.5. Myokarditis im Mausmodell

Tiermodelle stellen eine gute Möglichkeit zur Simulation eines zu erforschenden Pathomechanismus dar. In vielen Fällen ist darauf kaum zu verzichten, da es *in vitro* beinahe unmöglich ist, die komplexen Abläufe eines gesamten Organismus nachzustellen. Da die Ergebnisse dieser Arbeit mit Hilfe eines Mausmodells zur Myokarditis erarbeitet wurden, sollen die beiden relevantesten etablierten Modelle im Folgenden kurz vorgestellt werden.

1.5.1. Coxsackievirus B3 (CVB3) - Infektion

In diesem Modell wird die Myokarditis und DCM bei Mäusen durch eine Infektion mit CVB3 induziert. Um eine entsprechende Entzündungsreaktion hervorzurufen, wird den BALB/c Mäusen *intrapitoneal* (ip) in Anwesenheit von Herzantigen kultiviertes CVB3 und kardiales Myosin injiziert. Daraufhin bilden die Tiere zwischen Tag 7 und Tag 14 eine akute Myokarditis aus, die ab Tag 35 bis Tag 56 in eine chronische Myokarditis und DCM übergeht (FAIRWEATHER et al., 2001). Hierbei ist es wichtig, dass für die Versuche männliche BALB/c-Tiere verwendet werden, da andere Mauslinien wie z.B. C57BL/6 keinen substantiellen Phänotyp ausbilden. Auch weibliche Tiere sind für die Ausbildung der Myokarditis weniger suszeptibel als männliche Tiere (FAIRWEATHER und ROSE, 2007).

Die akute Phase einer durch eine CVB3-Infektion induzierten Myokarditis ist charakterisiert durch fokal auftretende Herde von zellulärem Infiltrat einhergehend mit einem geringen Grad an Nekrose oder Narbenbildung. Dieses Infiltrat ist zusammengesetzt aus hauptsächlich polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN), Makrophagen, CD4 T-Zellen, CD8 T-Zellen, T-Killerzellen, Mastzellen und dendritischen Zellen. Bei der akuten Phase dieses Modells kommt es im Zuge der Erkrankung nur selten zum Tod der Tiere

(FAIRWEATHER und ROSE, 2007). Eine Virusreplikation in diesem Modell findet nur auf einem sehr niedrigen Level statt und führt dazu, dass an Tag 14 nach der Infektion keine infektiösen Viren mehr in den Herzen nachgewiesen werden können. Daher kommt es im chronischen Verlauf nicht zu einer Reaktivierung der Infektion (FAIRWEATHER et al., 2001). Bei Mausstämmen wie beispielsweise BALB/c, kann aus der akuten eine chronische Phase der Erkrankung hervorgehen. Hierbei kommt es in etwa an Tag 35 zu einem Infiltrat aus mononukleären Zellen und damit verbundener großflächiger Nekrose und Narbenbildung in den Herzen. Zusätzlich wird die Entwicklung einer DCM und Perikarditis beobachtet (FAIRWEATHER et al., 2001). Weiterhin bildet das Immunsystem in dieser Phase Autoantikörpern gegen kardiales Myosin (ROSE und HILL, 1996). Auch bei anderen, eigentlich resistenten Mausstämmen wie C57BL/6 kann es in diesem Modell zur Bildung von Autoantikörpern gegen kardiales Myosin kommen. Voraussetzung hierfür ist jedoch die zusätzliche Stimulation mit TNF- α , Interleukin-1 (IL-1) oder Lipopolysaccharid (LPS) (LANE et al., 1992).

1.5.2. Immunisierung mit kardialem Myosin

Kardiales Myosin stellt eines der Hauptantigene der autoimmunen Immunantwort während der chronischen Phase der Myokarditis im Modell der CVB3-induzierten Myokarditis dar (NEU et al., 1987b). Diese chronische Phase des bereits beschriebenen Modells kann durch die Immunisierung der Tiere mit reinem kardialem Myosin ohne deren vorherige Virusinfektion simuliert werden. Wie Neu et al. zeigen konnten, wird durch die Injektion von kardialem Myosin in Kombination mit dem starken T-Zell-Aktivator *Complete Freund's Adjuvant* (CFA) bei bestimmten, empfänglichen Mausstämmen eine Myokarditis induziert. Dabei ist es wichtig zu erwähnen, dass die Tiere mit der Isoform des kardialen Myosins immunisiert werden müssen, da Myosin aus der Skelettmuskulatur nicht den gewünschten Effekt erzielen konnte. Weiterhin sind bei diesem Modell, wie auch schon im CVB3-Modell beobachtet, nicht alle Mausstämme suszeptibel für die Ausbildung einer Myokarditis. So scheinen beispielsweise wiederum C57BL/6-Tiere resistent zu sein, während männliche BALB/c einen deutlichen Phänotyp ausbilden (NEU et al., 1987a). Durch die Emulsion aus kardialem Myosin und CFA wird eine Autoimmunreaktion ausgelöst, die bei empfänglichen

Mäusen an Tag 21 ihren Höhepunkt erreicht (AFANASYEVA et al., 2001a; KANIA et al., 2009). Hierbei konnte die Forschergruppe um *Afanasyeva et al.* mittels Durchflusszytometrie verschiedene Subpopulationen eingewanderter Entzündungszellen in den Herzen identifizieren. Akut erkrankte Tiere wiesen demzufolge zum einen signifikant erhöhte Anteile an CD45+ Zellen (Gesamtheit der Leukozyten) im Vergleich zu Herzen nicht erkrankter Tiere auf. Zum anderen waren auch die Populationen CD3+ (T-Zellen), CD4+ (T-Helferzellen), CD8+ (zytotoxische T-Zellen), CD19 (B-Zellen), CD11b+/Gr-1- (Makrophagen) und CD11b+/Gr-1+ (neutrophile Granulozyten) bei diesem Modell bei Tieren mit akuter Myokarditis deutlich erhöht (AFANASYEVA et al., 2004).

Die Tatsache, dass sich die durch Myosin induzierte Myokarditis ebenso mittels eines adoptiven Transfers von T-Zellen erkrankter Tiere in gesunde Tiere übertragen lässt, deutet darauf hin, dass es sich bei dieser Erkrankung um einen hauptsächlich T-Zell gesteuerten Pathomechanismus handeln könnte (SMITH und ALLEN, 1991). Interessanterweise konnte ebenso gezeigt werden, dass der Transfer dendritischer Zellen aus erkrankten Tieren in gesunde Tiere zur Ausbildung einer Myokarditis führt (ERIKSSON et al., 2003c).

Ein weiterer Versuchsansatz mit dem Ziel, eine experimentelle Myokarditis zu induzieren, stellt die Applikation von monoklonalen Antikörpern gegen kardiales Myosin dar. Voraussetzung hierfür ist allerdings, dass der entsprechende Mausstamm entweder Myosin selbst oder zumindest ein Myosin ähnliches Molekül in der kardialen extrazellulären Matrix exprimiert. Dadurch wird veranschaulicht, dass für das Induzieren der Myokarditis nicht nur eine Aktivierung autoreaktiver Antikörper notwendig ist, sondern zusätzlich eine entsprechende Sensitivität der Organe für diese Autoantikörper vorhanden sein muss (LIAO et al., 1995).

Studien zur genaueren Untersuchung der Pathomechanismen zur Induktion und zur Aufrechterhaltung der EAM legen nahe, dass sowohl das angeborene als auch das adaptive Immunsystem für die Entwicklung der Erkrankung von Bedeutung sind. Bei diesem Prozess stellen vor allem autoreaktive T-Zellen (SMITH und ALLEN, 1991), herzspezifische Autoantikörper (NEUMANN et al., 1990; NEUMANN et al., 1992), verschiedene Zytokine und Chemokine (AFANASYEVA et al., 2001a; AFANASYEVA et al., 2001b; ERIKSSON et al., 2003b), T-Killerzellen (FAIRWEATHER et al., 2001) und das

Komplementsystem (KAYA et al., 2001) wichtige Bausteine dar.

1.6. Zelluläres Infiltrat während der Myokarditis

Zellulär entzündliches Infiltrat spielt eine entscheidende Rolle während der Entwicklung der Myokarditis. Mit Hilfe von Tiermodellen ist es möglich zu analysieren, welche Zeitpunkte der Erkrankung für die Einwanderung der verschiedenen Zellpopulationen relevant sind. Wie bereits in 1.4.2. beschrieben, kommt es während der akuten Phase der Myokarditis zur Extravasation von Leukozyten und deren Subpopulationen bestehend aus Monozyten, Makrophagen, zytotoxischen T-Zellen, T-Helferzellen und neutrophilen Granulozyten in das Herzmuskelgewebe (AFANASYEVA et al., 2004). Da in der vorliegenden Arbeit ein besonderes Augenmerk auf die Rolle von PMN im pathologischen Prozess der Myokarditis gelegt werden soll, wird diese Zellpopulation in einem separaten Kapitel behandelt.

2. Neutrophile Granulozyten (PMN)

PMN gehören zu den weißen Blutkörperchen, sind bereits vollständig differenziert und kämpfen im Zuge der primären Immunantwort des Organismus an vorderster Front gegen eingedrungene Pathogene. PMN haben im zirkulierenden Blut eine eher kurze Lebensdauer. Sie besitzen wie andere Immunzellen die Eigenschaft, im Falle einer Infektion oder Entzündung, durch das Endothel der Gefäße in das entsprechende Gewebe zu migrieren, um dort beispielsweise Bakterien oder Viren zu phagozytieren. Eosinophile, basophile und neutrophile Granulozyten bilden zusammen mit Mastzellen die Familie der Granulozyten (BORREGAARD, 2010; BRINKMANN und ZYCHLINSKY, 2012).

2.1. Neutrophil Extracellular Traps (NETs)

Im Jahr 2004 konnte erstmals nachgewiesen werden, dass PMN neben der Eigenschaft, Pathogene zu phagozytieren, die besondere Fähigkeit besitzen, sogenannte NETs zu bilden, um Mikroorganismen zu immobilisieren und abzutöten (BRINKMANN et al., 2004). NETs sind das Ergebnis einer speziellen und einzigartigen Form des Zelltods von PMN mit der Absicht, eine Vermehrung der eingedrungenen Erreger zu verhindern. Dabei kommt es u.a. durch Sekretion von Zytokinen bereits Minuten nach Aktivierung zur Adhäsion und zur Abflachung von PMN. Einhergehend mit dem Untergang der Zellgranula kommt es während der ersten Stunde nach Aktivierung der Zellen in deren Kern zu einer Dekondensierung der Chromosomen. Dies wird begleitet von einer voranschreitenden Trennung der inneren und äußeren Kernmembranen. Schlussendlich runden sich die Zellen ab, bevor die Zellmembran reißt und es durch Ausschüttung des Zellinhaltes in den extrazellulären Raum zur Bildung der NETs kommt (FUCHS et al., 2007). Die so ausgeworfenen extrazellulären „Pathogenfallen“ beinhalten neben Chromatin des Zellkerns auch antimikrobielle Peptide und Enzyme wie beispielsweise neutrophile Elastase (NE), Cathepsin G oder Myeloperoxidase (MPO), die aus den Granula der untergegangenen Granulozyten stammen (BRINKMANN et al., 2004). Eine wichtige Rolle scheint hierbei die *Peptidyl Arginin Deiminase 4* (PAD4) zu spielen. PAD bilden eine Familie von Enzymen mit der Eigenschaft Arginin zu Citrullin zu konvertieren

(VOSSENAAR et al., 2003). Diese Citrullinierung ist nach einer Studie von *Wang et al.* für die Formation von NETs essentiell. Demnach steht die Citrullinierung von Histonen des Zellkerns durch PAD4 in direktem Zusammenhang mit der Dekondensierung des Chromatins während der NET-Bildung (WANG et al., 2009; LI et al., 2010). Mögliche Stimuli für diese spezielle Form des Zelltodes der PMN sind u.a. TNF, Interleukin-8 (IL-8) und Interferon- γ (INF- γ) (BRINKMANN et al., 2004; MARTINELLI et al., 2004; NEELI et al., 2008).

Da NETs eine sehr instabile Struktur darstellen, ist es nicht leicht, diese nachzuweisen und quantitativ zu bestimmen. Eine Möglichkeit hierfür besteht allerdings darin, sich deren Eigenschaft zu Nutze zu machen, dass während der Bildung von NETs Chromatin eng an neutrophile Peptide wie NE oder MPO gebunden ist. Der Nachweis dieser Bindung gibt daher deutliche Hinweise für eine vorliegende NET-Formation und grenzt eine Fehlinterpretation durch eine andere Form des Zelltodes weitestgehend aus. So können NETs durch immunhistochemische Färbung von Chromatin des Zellkerns in Verbindung mit MPO oder NE sowohl in Gewebe als auch *in vitro* sichtbar gemacht werden (BRINKMANN et al., 2004; METZLER et al., 2011).

Neben der immunsystemunterstützenden Wirkung von NETs durch deren antimikrobielle Wirkung gibt es jedoch auch Hinweise darauf, dass NETs unter Umständen zu einer Schädigung von Gewebe durch inflammatorische Prozesse bis hin zu einer Förderung von Autoimmunerkrankungen führen können (KAPLAN und RADIC, 2012). So trägt die Bildung von NETs zwar grundsätzlich dazu bei, dass das Immunsystem in Alarmbereitschaft versetzt wird, indem DNA-Rezeptoren wie TLR9 aktiviert werden, jedoch kann die Aktivierung dieser Rezeptoren unter Umständen auch zu einer Autoimmunität beitragen (BRINKMANN und ZYCHLINSKY, 2012).

2.1.1. NETs bei Erkrankungen

In diesem Abschnitt sollen einige Pathologien beschrieben werden, bei denen das Auftreten von NETs für den Pathomechanismus der Erkrankung von Bedeutung ist.

2.1.1.1. Mukoviszidose

Mukoviszidose ist eine streng erbliche Erkrankung der Atemwege, die in Europa relativ häufig diagnostiziert wird und durch eine Mutation des *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator* (CFTR)-Gen verursacht wird (CUTTING, 2015). Dabei kommt es bei den Betroffenen zur Produktion großer Mengen zähflüssigen Schleims, der es Krankheitserregern wie Bakterien vereinfacht, sich in den Atemwegen anzusiedeln und zu vermehren (DAVIS, 2006). Aufgrund dessen leiden die Patienten an einer anhaltenden Entzündungsreaktion mit starker Beteiligung von PMN. Im Jahr 2012 konnte *Manzenreiter et al.* zeigen, dass im Auswurf der Mukoviszidose-Patienten NETs zu finden sind (MANZENREITER et al., 2012). Indem das in den NETs enthaltene Chromatin zu einer gesteigerten Viskosität des Auswurfs beiträgt, scheint der DNA-Bestandteil im Speziellen für diese Symptomatik verantwortlich zu sein. Um den Auswurf verflüssigen zu können und die Befreiung der Atemwege zu vereinfachen, werden Mukoviszidose-Patienten daher mit DNA-spaltenden Enzymen behandelt. Bei diesem Prozess wird jedoch auch die in den NETs gebundene NE freigesetzt, die wiederum zu einer Schädigung des Gewebes beizutragen scheint (ROGHANIAN und SALLENAVE, 2008). Andererseits trägt die für die NET-Formation notwendige NE jedoch auch dazu bei, das im Auswurf vorhandene Chromatin weiter zu dekondensieren und bewirkt dadurch ebenso eine Verflüssigung des Auswurfs (PAPAYANNOPOULOS et al., 2011).

2.1.1.2. Arterielle und venöse Thromben

Sowohl bei Arterien als auch bei Venen kann es entweder durch eine Verletzung des Gefäßes oder durch reduzierte Flussgeschwindigkeit des Blutes zur Bildung von Thromben kommen. Die hierbei vermehrt angesammelten PMN werden u.a. durch aktivierte Thrombozyten zur Bildung von NETs angeregt (CLARK et al., 2007; CAUDRILLIER et al., 2012). Diese wiederum können nun als eine Gerüststruktur für den sich stetig entwickelnden Thrombus fungieren (FUCHS et al., 2010). Sowohl NE als auch Cathepsin G sind an diesem Mechanismus beteiligt. *Massberg et al.* konnten zeigen, dass Mäuse ohne diese beiden Enzyme während der arteriellen Thrombenbildung eine reduzierte Fibrinausschüttung und eine verringerte Zeitspanne bis zur Koagulation aufwiesen. Zusätzlich konnte dieser Effekt auch durch Behandlung von Wildtyp-Mäusen (WT) mit anti-NET-

Antikörper erzielt werden (MASSBERG et al., 2010). Bemerkenswert ist hierbei, dass bei Mäusen mit systemischer *Escherichia coli*-Infektion und normaler NET-Formation die nachgewiesene Menge von Bakterien in Blutkapillaren der Leber niedriger war als bei mit anti-NET-Antikörper behandelten Tieren (MASSBERG et al., 2010). Diese Beobachtung lässt vermuten, dass die durch NET-Formation bedingte Bildung von Thromben eine Ausbreitung von Bakterien im Organsystem eindämmt und NETs somit auch indirekt zur Verteidigung des Organismus gegen Pathogene beitragen können (BRINKMANN und ZYCHLINSKY, 2012).

Jedoch gibt es auch in diesem Zusammenhang Hinweise darauf, dass die NET-Formation während der Thrombenbildung ebenso negative Auswirkung auf das Gefäßsystem zur Folge haben kann. So wurde in einem Tiermodell mit Ratten zur Erforschung abdominaler Aortenaneurysmen nachgewiesen, dass intraluminale Thromben hohe Mengen an NETs beinhalten, die zu einer Schädigung des darunterliegenden Endothels beitragen könnten (DELBOSC et al., 2011). Diese Behauptung wird durch eine Studie von *Gupta et al.* untermauert. Daraus geht hervor, dass die in NETs enthaltenen Enzyme direkt den Zelltod von Endothelzellen einleiten können (GUPTA et al., 2010; SAFFARZADEH et al., 2012).

2.1.1.3. Systemischer Lupus Erythematoses (SLE)

SLE beschreibt eine häufig bei jungen Frauen auftretende Autoimmunerkrankung, die mit der Bildung von Autoimmunantikörpern gegen Antigene der Zellkerne einhergeht und so in einer Entzündung von Organen wie beispielsweise Haut, Nieren oder Gelenken resultieren kann. Es verdichten sich zusätzlich die Hinweise, dass die Erkrankung durch ein höheres Risiko der Betroffenen zur Entwicklung von Atherosklerose vermehrt zu Komplikationen des kardiovaskulären Systems führt (UROWITZ et al., 1976; ROMAN et al., 2003).

Es konnte gezeigt werden, dass bei einigen SLE-Patienten ein Defizit beim Abbau von NETs besteht (HAKKIM et al., 2010) und dadurch die Erkrankung in ihrer Schwere anzusteigen scheint (LEFFLER et al., 2012). Ähnliche Beobachtungen konnten auch im Jahr 2011 von *Villanueva et al.* gemacht werden. Die Forschergruppe konnte darstellen, dass NET-Formation bei SLE-Patienten zu Schädigungen des Endothels und zur Inflammation und Infiltration des

darunterliegenden Gewebes führt (VILLANUEVA et al., 2011). Diese Studien legen nahe, dass die Blockade der NET-Formation ein mögliches Ziel zur Behandlung von SLE darstellen könnte. Eine mögliche Strategie könnte hierbei die Inhibition von PAD4 darstellen. Es konnte gezeigt werden, dass dieses Enzym bei der Immunreaktion durch NETs von essentieller Wichtigkeit ist (LI et al., 2010). Darauf aufbauend konnten *Knight et al.* in einem SLE-Mausmodell zeigen, dass die Blockade von PAD4 durch N- α -benzoyl-N5-(2-chloro-1-iminoethyl)-L-ornithine amide (Cl-amidine) bei den Versuchstieren zu signifikanten Veränderungen des Autoantikörperlevels im Blut führt. Weiterhin profitierten die mit Cl-amidine behandelten Tiere von einer verbesserten Funktion des Endothels und einer Verzögerung der durch fotochemische Verletzung induzierten arteriellen Thrombenbildung (KNIGHT et al., 2013). Diese Ergebnisse lassen eine Abschwächung des SLE-Phänotyps und eine Milderung der Symptomatik durch die Blockade von PAD4 vermuten und könnten vor allem im Hinblick auf kardiovaskuläre Risiken bei SLE-Patienten eine interessante Therapiemöglichkeit darstellen.

2.1.1.4. Myokarditis

Trotz ausgiebiger Literaturrecherche zeigte sich, dass bisher weder beim Menschen noch im Tiermodell Studien zu einer Beteiligung von NETs im Rahmen der Myokarditis durchgeführt wurden. Die vorliegende Arbeit soll u.a. einen Teil dazu beitragen, diese spezielle Immunreaktion von PMN in Zusammenhang mit der Blockade des Wachstumsfaktors MK besser zu verstehen.

3. Midkine (MK)

Das Zytokin Midkine ist ein Heparin-bindender Wachstumsfaktor, der vorwiegend bei der embryonalen Entwicklung von Bedeutung ist und mit Pleiotrophin (PTN) eine Familie bildet. Das Molekül wurde in den 80er Jahren erstmals beschrieben (KADOMATSU et al., 1988) und zunächst nach seinen Entdeckern Muramatsu und Kadomatsu MK1 benannt. Als sich im weiteren Verlauf der Forschung zeigte, dass das Zytokin hauptsächlich während der *Mid-gestation* der Embryogenese exprimiert wird, wurde es umbenannt zu Midkine (TSUTSUI et al., 1991).

Obwohl MK im adulten Organismus unter physiologischen Bedingungen stark herunterreguliert wird und nur noch eine untergeordnete Rolle zu spielen scheint, zeigen beispielsweise diverse Tumorzellen eine hohe Expression des Wachstumsfaktors. Diese erhöhte Expression wird u.a. bei Blasenkarzinomen oder Neuroblastomen in direkten Zusammenhang mit einer schlechten Prognose für die betroffenen Patienten gebracht (NAKAGAWARA et al., 1995; O'BRIEN et al., 1996; MAEDA et al., 2007; RUAN et al., 2007). Wie mehrere Studien verdeutlichen, scheint MK für Tumoren im Hinblick auf Wachstum, Invasion, Angiogenese und Überleben eine wichtige Rolle zu spielen (CHOUDHURI et al., 1997; MURAMAKI et al., 2003). Weiterhin konnte MK auch in gutartigem Gewebe nachgewiesen werden. So wird der Wachstumsfaktor unter hypoxischen Bedingungen von PMN, Monozyten und Endothelzellen exprimiert. Eine MK-Sekretion während Hypoxie konnte interessanterweise jedoch nur von Endothelzellen beobachtet werden (WECKBACH et al., 2012).

Zusätzlich verdichten sich die Hinweise darauf, dass MK auch bei inflammatorischen Prozessen von Bedeutung sein könnte und der Wachstumsfaktor daher ein mögliches therapeutisches Ziel darstellt. So wurde eine Rolle von MK beispielsweise bei Nierenerkrankungen (KOSUGI et al., 2007), rheumatischer Arthritis (MARUYAMA et al., 2004), entzündlichen Darmerkrankungen (KRZYTEK-KORPACKA et al., 2010) oder auch bei der Autoimmunerkrankung Multiple Sklerose (WANG et al., 2008) nachgewiesen.

3.1. Protein und Gen

MK hat ein Molekulargewicht von 13 kDa, enthält eine Vielzahl basischer Aminosäuren (TOMOMURA et al., 1990) und besteht hauptsächlich aus zwei ungefähr gleich großen Domänen, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind (FABRI et al., 1993). Sowohl die N-terminale als auch die C-terminale Domäne bestehen aus je drei antiparallelen β -Strängen. Die basischen Aminosäuren bilden in der C-terminalen Domäne zwei Gruppen, die weitestgehend für die Heparin-bindende Eigenschaft des Moleküls verantwortlich sind (ASAI et al., 1997; IWASAKI et al., 1997; AKHTER et al., 1998). Da in der N-terminalen Domäne zwar auch einige basische Aminosäuren zu finden sind, deren Wirkung jedoch möglicherweise durch gleichermaßen vorhandene Aminosäuren mit saurem Charakter aufgehoben wird, erweist sich diese Domäne als die biologisch deutlich inaktivere der beiden (IWASAKI et al., 1997). Obwohl folglich die C-terminale Domäne die wichtigere der beiden zu sein scheint, konnte gezeigt werden, dass für die Funktionalität des Moleküls die C-terminale Domäne allein nicht ausreichend ist. Um einen Effekt bewirken zu können, muss MK in seiner vollen Länge inklusive der N-terminalen Domäne vorhanden sein (KOJIMA et al., 1995). Der evolutionäre Ursprung der C-terminalen und der N-terminalen Domäne muss noch geklärt werden. Betrachtet man die strukturellen Ähnlichkeiten zwischen den beiden Domänen liegt folgende Vermutung nahe: Ein ursprüngliches Molekül mit hoher Ähnlichkeit zu MK und PTN könnte aus der intrachromosomalen Rekombination eines ursprünglichen Gens, welches die ursprüngliche Domäne kodierte, resultieren sein. Daraufhin könnten die Moleküle MK und PTN aus der Rekombination dieses Chromosomenabschnittes entstanden sein (MURAMATSU, 2014).

Während humanes MK-Gen (MDK) auf Chromosom 11 lokalisiert ist, konnte das MK-Gen der Maus (Mdk) auf Chromosom 2 nachgewiesen werden (SIMON-CHAZOTTES et al., 1992; KANAME et al., 1993). Sowohl humanes als auch murines MK besteht jeweils aus vier Exons, die zwischen beiden Spezies eine hohe Homologie aufweisen. Insgesamt stimmt die Aminosäuresequenz von humanem und murinem MK zu 87% überein (Tab. 2). Darüber hinaus weist auch das der Familie der Heparin-bindenden Wachstumsfaktoren angehörige PTN eine Übereinstimmung der Aminosäuresequenz von 50% zu MK auf (LI et al., 1990; TSUTSUI et al., 1991; UEHARA et al., 1992).

Tabelle 3: Vergleich der Homologie zwischen Aminosäuresequenzen von humanem und murinem MK modifiziert nach Weckbach et al. (WECKBACH et al., 2011). Übereinstimmungen sind gelb hinterlegt.

Humanes MK	1	KKKDKVKKGGPGSECAEWAWGPCTPSSKDCGVGFREGTCGA
Murines MK	1	KKKEKVKK----GSECTEWAWGPCTPSSKDCGVMFREGTCGA
Humanes MK	42	DKYKFENWGACDGGTGKVRQQTQRIRCRVPCNWKKEFGA
Murines MK	39	DKYKFE SWGACDGS TGTKARQQTQRVHCKVPCNWKKEFGA
Humanes MK	83	GTLKKARYNAQCQETIRVTKPCTPKTKAKAKAKKGKGD
Murines MK	80	GTLKKARYNAQCQETIRVTKPCTSKTKSKTKAKAKKGKGD

Wie bereits erwähnt, sind die basischen Aminosäuren für die Heparin-bindende Eigenschaft von MK von besonderer Bedeutung. Die hohe Konservierung der basischen Aminosäuren wie beispielsweise Lysin zwischen verschiedenen Spezies verdeutlicht deren Wichtigkeit für die Funktion des Wachstumsfaktors (ASAI et al., 1997). Die Konservierung von Lysin (K) zwischen Maus und Mensch ist weiterhin in der Aminosäuresequenz in Tabelle 3 zu erkennen.

3.2. MK-Rezeptoren

MK ist in der Lage, eine Vielzahl von Rezeptoren zu binden (Tab. 4). So konnte gezeigt werden, dass die Fähigkeiten von MK, beispielsweise Zellwachstum, Überleben, Zellwanderung und Genexpression verschiedener Zelllinien zu fördern, vermutlich über Rezeptorkomplexe vermittelt werden, die aus mehreren Molekülen bestehen (MURAMATSU, 2010). Einen der wichtigsten Rezeptoren stellt hier receptor-like protein tyrosine phosphatase zeta (PTP ζ) dar, welches während der embryonalen Entwicklung im zentralen Nervensystem im Überfluss exprimiert wird und dort u.a. Zelladhäsion und intrazelluläre Signalübertragung vermittelt (BOUYAIN und WATKINS, 2010). PTP ζ ist ein membranständiges Protein mit einer intrazellulären Tyrosin-Phosphatase-Aktivität und einer Koppelung an eine extrazelluläre Chondroitinsulfat-Kette. MK hat die Fähigkeit, an diese Chondroitinsulfat-Proteoglykane zu binden (NAKANISHI et al., 1997; UEOKA et al., 2000). *Maeda et al.* konnten zeigen, dass nach Entfernen der Chondroitinsulfat-Kette die Dissoziationskonstante (Kd) für die Bindungsfähigkeit von MK an PTP ζ von 0,56 nM auf 8,8 nM ansteigt, wodurch

die Bedeutung der Chondroitinsulfat-Kette für die Ligand-Rezeptor-Bindung verdeutlicht wird. Der Eindruck, dass die C-terminale Domäne die bedeutendere Rolle der beiden Domänen zu spielen scheint, wird auch hier bestätigt. Interessanterweise bindet nur die C-terminale und nicht die N-terminale Domäne an PTP ζ . Folglich ist es auch die C-terminale Domäne, die für die Zellmigration embryonaler Neuronen und deren verlängerte Überlebensdauer während der embryonalen Entwicklung verantwortlich ist. Der MK-PTP ζ -Wirkmechanismus ist daher in zelluläre Differenzierung, Vermehrung, Wanderung und Adhäsion während der neuronalen Organentwicklung involviert (MAEDA und NODA, 1998; MAEDA et al., 1999; SAKAGUCHI et al., 2003).

Weitere wichtige MK-Rezeptoren gehören der Familie der *Low Density-Lipoprotein Receptor-Related Proteins* (LRP) an und schließen LRP-1, LRP-6, megalin/brushin und apoE Rezeptor-2 mit ein (MURAMATSU et al., 2000; SAKAGUCHI et al., 2003). Es konnte dargestellt werden, dass im Speziellen LRP-1 als MK-Rezeptor von Bedeutung sein könnte. Gebunden an MK fördert LRP-1 die Überlebensdauer embryonaler Neuronen und schützt embryonale Stammzellen der Maus vor hypoxischem Schaden. Mit einer Kd von 3,5 nM besitzt LRP-1 im Vergleich zu den anderen Mitgliedern der LRP-Familie die besten Bindungseigenschaften zu MK (MURAMATSU et al., 2000; SAKAGUCHI et al., 2003; LEE et al., 2012). Aus der Arbeit von *Weckbach et al.* geht weiterhin hervor, dass die Blockade von LRP-1 durch *Low Density Lipoprotein Receptor-Related Protein-Associated Protein* (LRPAP) in einer signifikant verringerten Bindung an PMN der Maus resultiert. MK und β_2 -Integrine scheinen hier zu kooperieren, indem MK durch die Bindung an LRP-1 eine Transformation der β_2 -Integrine in ein hochaffines Stadium vermittelt und so die Adhäsion während der Rekrutierung von PMN bei akuten entzündlichen Prozessen begünstigt.

Anaplastic lymphoma kinase (ALK) konnte ebenfalls als Rezeptor für MK identifiziert werden. Hierbei konkurriert MK mit dem zweiten Mitglied der Heparin-bindenden Wachstumsfaktoren PTN um die Bindung an ALK. Weiterhin konnte in ALK-positiven Zellen der Linien WI-38 (humane Fibroblasten), HUVECs (human umbilical vein endothelial cells), Neuroblastomzellen und Glioblastomzellen eine MK-abhängige Signalübertragung über PI3-Kinase und MAP-Kinase gezeigt werden. Aus ihren Erkenntnissen schließen *Stoica et al.*,

dass MK durch die Bindung an ALK während der Tumorgenese eine Signalrolle zukommt, die Wachstum, Überlebensdauer und Angiogenese des Tumors unterstützt (STOICA et al., 2002).

Wie bereits zuvor beschrieben, kann MK an die Chondroitinsulfat-Kette der PTP ζ binden (MAEDA et al., 1999). Neuroglycan C (NGC) ist ein Chondroitinsulfat-Proteoglykan, das ausschließlich im zentralen Nervensystem exprimiert wird und hier bei der Entwicklung des Gehirns mitwirkt (OOHIRA et al., 2004). NGC wurde als Rezeptor für MK in einer Oligodendroglia-Vorläuferzelllinie bestätigt. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Bindungsaffinität von MK zu NGC durch Entfernen der Chondroitinsulfat-Kette deutlich reduziert wurde (ICHIHARA-TANAKA et al., 2006). Die Erkenntnis, dass eine Vielzahl der MK-bedingten Effekte durch die Gabe von Heparin oder durch Inaktivierung der für die Bindung wichtigen Kohlenhydrate, wie beispielsweise Chondroitinsulfat, aufgehoben werden kann, verdeutlicht deren Wichtigkeit beim MK-Signalweg (ZOU et al., 2003).

Auch zum transmembranständigen Rezeptor *Notch2* konnte eine Bindung von MK gezeigt werden. *Notch* ist ein Transmembranprotein, bestehend aus einer Transmembrandomäne und einer extrazellulären Domäne. Dieses wird vorwiegend im Embryo exprimiert und kann möglicherweise bei Metastasierung von Tumoren reaktiviert werden (TIMMERMAN et al., 2004). Epithelial-mesenchymale Transition (EMT) ist ein Prozess, der ebenfalls während der Embryogenese und Metastasierung von Tumoren beschrieben ist, und dort durch Lockerung von Zellverbänden eine Zellmigration ermöglicht (HUBER et al., 2005).

Immortalisierte HaCaT-Keratinocyten, die MK exprimieren oder mit MK behandelt wurden, zeigten in vitro deutliche morphologische Veränderungen ähnlich der EMT und lassen daher auf eine Beteiligung von MK bei der EMT schließen. Diese Veränderungen sind bedingt durch eine verminderte Expression epithelialer Marker und eine Anreicherung fibroblastischer Marker (HUANG et al., 2008).

Bei allgemeiner Betrachtung lässt sich festhalten, dass MK an eine Vielzahl verschiedener Rezeptoren bindet und so unterschiedlichste intrazelluläre Signalwege beeinflussen kann. Spezielle Signalwege, welche die Effekte von MK

auf inflammatorische Prozesse beschreiben und somit für die vorliegende Arbeit von besonderem Interesse wären, sind jedoch weitestgehend unbekannt. Dennoch festigt sich der Eindruck, dass MK beim Verlauf unterschiedlicher entzündlicher Erkrankungen von Bedeutung sein kann.

Tabelle 4: Übersicht der MK-Rezeptoren modifiziert nach *Weckbach et al.* (WECKBACH, 2011)

<u>Rezeptor-Familie</u>	<u>MK-Rezeptor</u>	<u>Funktion</u>	<u>Literatur</u>
PTP	PTPζ	Migration und Überleben embryonaler Neuronen	(MAEDA et al., 1999; SAKAGUCHI et al., 2003)
LRP	LRP-1	Überleben embryonaler Neuronen, Schutz embryonaler Stammzellen vor hypoxischem Schaden, PMN-Adhäsion	(MURAMATSU et al., 2000; LEE et al., 2012; WECKBACH et al., 2014)
Integrine	$\alpha_6\beta_1$-Integrin	Neuronales Wachstum embryonaler Neuronen	(HUANG et al., 2008)
	$\alpha_4\beta_1$-Integrin	Migration von UMR-106 osteoblast-like cells	(MURAMATSU et al., 2004)
Rezeptor Tyrosin Kinase	ALK	Wachstum, Überleben, Angiogenese in Tumorzellen	(STOICA et al., 2002)
Notch	Notch 2	EMT immortalisierter Keratinozyten	(HUANG et al., 2008)
Kohlenhydrate	Neuroglycan C	Zellbindung bei Oligodendroglia-Vorläuferzellen	(ICHIHARA-TANAKA et al., 2006)

3.3. MK bei Erkrankungen

3.3.1. Die Bedeutung von MK bei inflammatorischen Prozessen

Es verdichten sich Hinweise, dass MK möglicherweise bei einer Vielzahl entzündlicher Prozesse involviert ist (Tab. 5). Diese Annahme wird u.a. dadurch gestützt, dass immobilisiertes MK über einen Integrin-abhängigen Mechanismus

in der Lage ist, die Adhäsion von Leukozyten am Endothel und damit die nachfolgende Extravasation in entzündetes Gewebe zu begünstigen (WECKBACH et al., 2014). Der folgende Überblick legt organspezifische entzündliche Pathologien dar, bei denen eine Bedeutung von MK näher beschrieben wurde.

3.3.1.1. Niere

Die durch Diabetes Typ 2 bedingte Nephropathie ist eine lebensbedrohliche Erkrankung. Sie stellt die häufigste Ursache für Niereninsuffizienz im Endstadium sowie die damit einhergehende Dialysepflicht der Patienten dar (RITZ und ORTH, 1999). MK, welches im adulten Organismus unter physiologischen Bedingungen nur sehr restriktiv exprimiert wird, konnte bei Epithelzellen des proximalen Tubulus der Niere nachgewiesen werden. Interessanterweise wurde der Wachstumsfaktor unter pathologischen Bedingungen, wie beispielsweise einer Nephropathie durch Diabetes oder Ischämie, hochreguliert (SATO et al., 2005; KOSUGI et al., 2006; KOSUGI et al., 2007). So konnte sowohl in Glomerula und Tubuli als auch im Interstitium des entzündeten Nierengewebes betroffener Patienten eine erhöhte MK-Expression im Vergleich zu gesunden Patienten festgestellt werden (KOSUGI et al., 2007). *Kosugi et al.* konnte in einem Mausmodell zur Simulation von Diabetes Typ 2 die Rolle von MK während des entzündlichen Prozesses weiter untermauern. In diesem Modell werden die β -Zellen des Pankreas der Tiere durch Applikation von Streptozotocin zerstört und somit eine Insulin-Produktion zur Regulation des Glukosespiegels verhindert. Tiere mit > 250 mg/dl Glukose im Blut wurden hierbei als diabetisch erachtet und zeigten im Versuchsverlauf tubulointerstitielle pathologische Veränderungen des Nierengewebes. Die Forschergruppe berichtet, dass MK-defiziente ($Mdk^{-/-}$) Mäuse im Vergleich zum WT zwar einen ähnlich hohen Glukosespiegel im Blut aufwiesen, die Tiere jedoch einen signifikant milderen Verlauf der Nephropathie zeigten (KOSUGI et al., 2006; KOSUGI et al., 2007). Weiterhin konnte in einem *in vitro*-Versuch dargestellt werden, dass Mesangiumzellen von $Mdk^{-/-}$ -Mäusen eine verminderte Phosphorylierung von Protein Kinase C aufwiesen, und dass diese durch eine externe Zugabe von MK wiederhergestellt werden konnte. Weiterhin führte *in vitro* die Zugabe von MK *antisense oligoDNA* zu Zellen aus WT zu einer verringerten Expression von MK (KOSUGI et al., 2006).

Ein weiteres Krankheitsbild, dessen Pathologie sich u.a. auf Ischämie-Reperfusionsschäden im Nierengewebe zurückführen lässt, stellt das akute Nierenversagen dar. Die beschriebenen Schädigungen des Organs treten bei Durchblutungsstörungen auf und sind daher beispielsweise bei einer Nierentransplantation unumgänglich. In einem entsprechenden Mausmodell konnte gezeigt werden, dass durch eine 90-minütige Ligatur der *A. renalis* die MK-Expression an Tag 2 des Versuchs signifikant anstieg (SATO et al., 2001; SATO et al., 2005). Bemerkenswerterweise zeigten sowohl *Mdk*^{-/-}-Tiere als auch MK *antisense oligoDNA* behandelte Wildtyp-Tiere im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren deutlich geringere Ischämie-Reperfusionsschäden (SATO et al., 2001; SATO et al., 2005).

Sowohl im beschriebenen Modell zur Nephropathie durch Diabetes Typ 2 als auch im Ischämie-Reperusionsmodell ist zu erkennen, dass der mildere Verlauf bei *Mdk*^{-/-}-Mäusen und MK *antisense oligoDNA* behandelten WT mit einer Reduktion der Leukozyteninfiltration in das geschädigte Nierengewebe korrelierte.

3.3.1.2. Darm

Morbus Crohn und *Colitis ulcerosa* sind chronisch entzündliche Darmerkrankungen, deren Ursache jedoch weitestgehend ungeklärt ist (MATTAR et al., 2011). In Tiermodellen konnte bereits gezeigt werden, dass MK bei entzündlichen Darmerkrankungen hochreguliert sein kann. So wurde MK als mögliche Folge einer erhöhten Expression von TNF- α und IL- β im Versuchsmodell für *Colitis ulcerosa* bei Ratten von Fibroblasten der Darmschleimhaut des Dickdarms vermehrt exprimiert. Yuki et al. konnten außerdem in einem *in vitro*-Modell mit kultivierten Epithelzellen zeigen, dass MK die Wundheilung beschleunigt (YUKI et al., 2006). Die beiden Zytokine TNF- α und IL- β werden auch beim Menschen während chronisch entzündlichen Darmerkrankungen vermehrt exprimiert (ABRAHAM und CHO, 2009). Bei klinischen Studien konnte dargelegt werden, dass auch beim Menschen durch die Entzündung des Dickdarms mit einer erhöhten Expression von MK gerechnet werden kann. Obwohl weitere Studien belegen, dass lösliches MK im Blut sowohl bei Patienten mit *Colitis ulcerosa* als auch bei Patienten mit *Morbus Crohn* erhöht

ist (KRZYTEK-KORPACKA et al., 2009; KRZYTEK-KORPACKA et al., 2010), wird eine erhöhte MK-Expression in Zellen des Darms jedoch ausschließlich bei *Colitis ulcerosa* und nicht bei *Morbus Crohn* beobachtet (KRZYTEK-KORPACKA et al., 2016).

3.3.1.3. Gelenke

Rheumatoide Arthritis (RA) ist eine progressiv fortschreitende, chronisch entzündliche Erkrankung der Gelenke, die in ihrem Verlauf Schäden und Deformationen derselben verursachen kann und dadurch die Lebensqualität der Betroffenen in erheblichem Maß einschränkt (FELDMANN et al., 1996). An dieser Autoimmunerkrankung leiden in etwa 0,5% bis 1% der adulten Bevölkerung, wobei tendenziell eher Frauen betroffen sind (GABRIEL und MICHAUD, 2009).

Die Studie von *Maruyama et al.* verdeutlicht, dass MK auch bei der Pathogenese dieser Erkrankung eine wichtige Rolle spielen könnte. So wurden bei RA-Patienten mittels ELISA in den meisten Fällen auch erhöhte Werte von MK in synovialer Flüssigkeit und im Serum der Patienten festgestellt. Zusätzlich zeigte sich hierbei eine Korrelation Menge an nachgewiesenem MK mit dem Wert des Rheumafaktors (RF) im Serum (MARUYAMA et al., 2004). Der RF wird definiert durch Autoimmunantikörper, welche bei RA-Patienten nachgewiesen werden können und kann daher Anhaltspunkte über die Schwere und einen möglichen Verlauf der Erkrankung geben. Aus den Gelenken der Patienten entnommene Makrophagen und Fibroblasten konnten mittels anti-MK-Antikörper und anti-Makrophagen-Antikörper (anti-CD68) angefärbt werden und könnten daher den Ursprung für nachgewiesenes MK in der synovialen Flüssigkeit darstellen (MARUYAMA et al., 2004).

Weiterhin konnte nach Induktion der RA im Tiermodell durch die Injektion von anti-Typ II Kollagen-Antikörpern und Lipopolisaccharid (LPS) (TERATO et al., 1992) gezeigt werden, dass MK die Migration inflammatorischer Leukozyten und die Differenzierung von Osteoklasten reguliert (MARUYAMA et al., 2004). Es konnte dargestellt werden, dass in den meisten $Mdk^{-/-}$ -Mäusen keine Induktion der RA möglich war und folglich an Tag 7 des Versuchs eine signifikant geringere Symptomatik der RA bei $Mdk^{-/-}$ -Mäusen im Vergleich zu WT festgestellt werden

konnte. Weiterhin wurde mittels ELISA gezeigt, dass der MK-Serumspiegel bei WT bis zu Tag 7 des Modells deutlich anstieg. Dies lässt darauf schließen, dass der Serumspiegel von MK in direktem Zusammenhang mit der Pathogenese der Erkrankung stehen könnte (MARUYAMA et al., 2004). Für weitere Analysen wurde Mdk^{-/-}-Mäusen rekombinantes MK *intraperitoneal* injiziert. Daraufhin wurde beobachtet, dass die behandelten Tiere nach Injektion ebenfalls eine RA ausbilden konnten (MARUYAMA et al., 2004). Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass MK im Speziellen bei der Pathogenese der RA, aber auch bei anderen durch entzündliche Prozesse verursachten Erkrankungen möglicherweise eine bedeutende Rolle spielen könnte.

3.3.1.4. Zentrales Nervensystem

Eine der am weitesten verbreiteten Erkrankungen des zentralen Nervensystems (ZNS) ist die Multiple Sklerose (MS). In Europa leiden etwa 500.000 Menschen an dieser chronisch verlaufenden Autoimmunerkrankung, die primär eine Zerstörung der Myelinscheiden im ZNS bewirkt und so die Reizleitung über Axone erschwert (HEMMER et al., 2002; FLACHENECKER et al., 2010). Das Tiermodell der experimentellen Autoimmunenzephalomyelitis (EAE) ist ein gut etabliertes und anerkanntes Modell zur Simulation der MS. Bereits in den 1930er Jahren gab es erste Versuche, ein solches Tiermodell unter Verwendung von Affen zu generieren (RIVERS et al., 1933). Dieser Versuch konnte bis Ende des 20. Jahrhunderts so weit verbessert werden, dass es möglich war, auch Nager in die Versuche mit einzuschließen (WEKERLE et al., 1994). Die Induktion der EAE soll hierbei durch die Immunisierung der Tiere mittels *Myelin Oligodendrozyt Glykoprotein* (MOG) Antigen und CFA erreicht werden und führt in der Folge zu einer TH1- und TH17- vermittelten Entzündungsreaktion im ZNS (LIU et al., 1994). Liu et al. konnten weiterhin zeigen, dass Ratten im EAE-Modell erhöhte Mdk-mRNA-Expression im Rückenmark aufwiesen und diese sich mit der Schwere der klinischen Symptome korrelieren ließ. Das Abklingen der klinischen Symptome führte im Umkehrschluss interessanterweise wiederum zur Senkung der Mdk-mRNA-Expression im Rückenmark (LIU et al., 1998). Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen eine Beteiligung von MK beim Verlauf der MS vermuten.

Wie bereits zuvor beschrieben, zeigten Studien zur Pathogenese der RA (MARUYAMA et al., 2004), dass MK bei autoimmun bedingte Erkrankungen eine wichtige Rolle spielen könnte und die Verwendung von Mdk^{-/-}-Mäusen im Versuchsmodell hilfreiche Aufschlüsse über die zugrunde liegenden Pathomechanismen geben kann. Auch im Modell der EAE fanden Mdk^{-/-}-Mäuse Verwendung. So beschreiben Wang et al., dass die durch MOG und CFA induzierte EAE bei Mdk^{-/-}-Mäusen einen deutlich abgeschwächten Verlauf aufwies und daher im Vergleich zu WT eine signifikant reduzierte klinische Symptomatik zeigten (WANG et al., 2008). Diese Ergebnisse korrelierten zusätzlich mit histologischen Analysen zur Bestimmung des Grades des entzündlichen Zellinfiltrats im Rückenmark der Tiere. Mdk^{-/-}-Mäuse zeigten hierbei signifikant weniger entzündetes Gewebe. Bemerkenswert ist, dass sowohl die mildere klinische Symptomatik als auch die reduzierte Inflammation des Rückenmarks bei Mdk^{-/-}-Mäusen durch die Administration von rekombinantem MK aufgehoben werden konnte (WANG et al., 2008). Um nun die Ursache für die beobachteten Effekte genauer eingrenzen zu können, sollte die Art der Immunantwort der Tiere genauer untersucht werden. Hierfür wurden periphere Lymphknoten der Tiere analysiert. Dabei stellte sich heraus, dass sich diese beim Vergleich von Mdk^{-/-}-Mäusen und WT zwar nicht in deren Menge enthaltener mononukleärer Zellen unterschieden, sehr wohl jedoch ein Unterschied bei der genaueren Analyse der Subpopulationen von T-Zellen zu erkennen war (WANG et al., 2008). Die CD4- und CD8-T-Zell-Populationen der beiden Gruppen wiesen keine Unterschiede auf und können somit keine Erklärung für den milderen Verlauf der EAE bei Mdk^{-/-}-Mäusen geben. Die Forschergruppe konnte jedoch darstellen, dass die CD4/CD25-T-Zellen bei Mdk^{-/-}-Tieren deutlich vermehrt waren. Diese Zellpopulation lässt sich definieren als Verbund sogenannter T-regulatorischer Zellen (Treg) und besitzt die Möglichkeit, autoreaktive TH1- und TH17-Zellen in ihrer Reifung zu unterdrücken (MILLS, 2004; WANG et al., 2008). Hier war es ebenfalls möglich durch Administration von rekombinantem MK die Expansion der Treg-Zell-Population in Mdk^{-/-}-Mäusen zu verhindern. Zusätzlich konnte in einem *in vitro*-Versuch mit isolierten CD4-Zellen aus der Milz und Stimulation durch MOG gezeigt werden, dass die Inkubation mit MK die Ausreifung zu Treg-Zellen dosisabhängig hemmen konnte. Auch *in vivo* war es möglich, den durch die erhöhte Treg-Zell-Population gewährleisteten Schutz der Mdk^{-/-}-Mäuse vor einer EAE aufzuheben. Dies geschah, indem durch

Injektion von anti-CD25 eine Inaktivierung von Treg-Zellen erreicht wurde.

Insgesamt konnte veranschaulicht werden, dass die Anwesenheit von MK zu einer verminderten Population T-regulatorischer Zellen führt und auf diese Weise der über TH1- und TH17-Zellen gesteuerte autoreaktive Mechanismus und die damit verbundene Zerstörung der Myelinscheiden gefördert werden kann (WANG et al., 2008). Diese Daten lassen den Schluss zu, dass die Anwesenheit von MK für die Entstehung und Entwicklung der EAE im Tiermodell mit hoher Wahrscheinlichkeit von essentieller Bedeutung ist.

3.3.1.5. Kreislaufsystem

Kardiovaskuläre Erkrankungen und ihre möglichen Konsequenzen sind ein lebensbedrohliches Risiko, das in industrialisierten Ländern eine der prominentesten Todesursachen darstellt (HAUSENLOY et al., 2013). Es gibt bereits vielversprechende Daten darüber, dass MK eine kardioprotektive Wirkung bei ischämisch bedingten Herzerkrankungen entfalten kann. In einem Versuch mit Ratten, deren Koronararterien experimentell okkludiert wurden, führte die intravenöse Injektion von MK zu einer deutlichen Verringerung der Infarktgröße (KADOMATSU et al., 2014). Diese Ergebnisse konnten *Horiba et al.* in einem Ischämie-Reperfusion-Tiermodell mit *Mdk*^{-/-}-Mäusen bestätigen. In WT war nach Okklusion einer Koronararterie eine deutlich erhöhte Expression von MK im Gewebe nahe des Infarktes zu beobachten, während die Abwesenheit von MK bei *Mdk*^{-/-}-Mäusen zu einer signifikanten Vergrößerung des Infarktareals führte (HORIBA et al., 2006). Wie bereits in anderen Modellen beschrieben, konnte dieser Effekt auch hier durch die Behandlung der Tiere mit rekombinantem MK aufgehoben werden. Die Infarktgrößen der *Mdk*^{-/-}-Mäuse konnten durch intrakardiomuskuläre Injektion von rekombinantem MK deutlich reduziert werden. Zusätzlich konnte durch die *in vitro*-Inkubation von Kardiomyozyten mit MK eine verringerte Apoptose der Zellen im Hypoxie-Reoxygenierungs-Versuch beobachtet werden (HORIBA et al., 2006). Auch in einem ähnlichen Ischämie-Modell mit Schweinen konnte durch die intrakoronare Injektion von MK eine Verkleinerung der Infarktgröße erreicht werden (ISHIGURO et al., 2011).

Atherosklerose beschreibt ein Krankheitsbild, bei dem es durch Fehlfunktionen des Endothels zu Plaque-Bildung und damit einhergehend zu chronischen

Entzündungen mittlerer und großer Arterien kommen kann. Arterien und Venen exprimieren unter physiologischen Bedingungen zwar kaum MK, nach experimentellem Setzen eines Stents im Tierversuch mit Kaninchen konnte in den betroffenen Gefäßen jedoch eine deutlich erhöhte Expression von MK gemessen werden. Diese ist wahrscheinlich durch entzündungsbedingt eingewanderte Makrophagen zu begründen (NARITA et al., 2008).

Nicht nur Makrophagen, sondern auch andere Entzündungszellen – insbesondere Leukozyten – spielen bei der Umstrukturierung des Gefäßes nach Atherosklerose bedingter Verletzung eine wichtige Rolle. Die durch Leukozyten sezernierten Zytokine fördern hierbei die Verdickung der Gefäßwand durch Initialisierung des Wachstums glatter Muskelzellen und halten die Entzündungsreaktion so weiter aufrecht (ROSS, 1999). Auch hier zeigt sich, dass $Mdk^{-/-}$ -Mäuse vor diesem Pathomechanismus geschützt zu sein scheinen. *Horiba et al.* konnten beobachten, dass sowohl die Leukozyten-Rekrutierung als auch der Prozess der Gefäßumstrukturierung bei $Mdk^{-/-}$ -Mäusen im Vergleich zum WT deutlich reduziert bzw. kaum nachzuweisen waren (HORIBA et al., 2000).

Tabelle 5: MK bei entzündlichen Erkrankungen

<u>Organ-system</u>	<u>Erkrankung/Modell</u>	<u>Rolle von MK</u>	<u>Literatur</u>
Niere	Diabetes Typ 2- bedingte Nephropathie	Fördert die tubulointerstitielle Entzündung in Zellinfiltration,	(KOSUGI et al., 2006; KOSUGI et al., 2007)
	Ischämie- Reperfusionsschäden	erhöhte MK-Expression im Gewebe	(SATO et al., 2001; SATO et al., 2005)
Darm	Colitis ulcerosa	Erhöhte MK-Expression im Gewebe, erhöhte Werte von freiem MK im Blut	(YUKI et al., 2006; KRZYTEK- KORPACKA et al., 2009; KRZYTEK- KORPACKA et al., 2016)
	Morbus Crohn	Erhöhte Werte von freiem MK im Blut, keine erhöhte MK Expression im Gewebe	(KRZYTEK- KORPACKA et al., 2010; KRZYTEK- KORPACKA et al., 2016)
Gelenke	Rheumatische Arthritis	Migration inflammatorischer Leukozyten, Differenzierung von Osteoklasten	(MARUYAMA et al., 2004)
Nerven-system	Multiple Sklerose (EAE)	Fördert die Entzündung des Rückenmarks, unterbindet Ausreifung von CD4- zu Treg-Zellen	(WANG et al., 2008)
Kreislauf-system	Ischämie- Reperfusion (Infarktmodell)	Kardioprotektive Wirkung, verringerte Apoptose von Kardiomyozyten	(HORIBA et al., 2006; KADOMATSU et al., 2014)
	Arteriosklerose	Restrukturierung der Gefäßwand, Infiltration der Gefäßwand durch entzündliches Infiltrat	(HORIBA et al., 2000; NARITA et al., 2008)

4. Fragestellung dieser Arbeit

Mit schätzungsweise 22 pro 100.000 Patienten jährlich stellt die Myokarditis zwar kein ausgesprochen häufiges, aber dennoch ein sehr bedeutendes Krankheitsbild dar, an dem oft junge Menschen erkranken, und für das es außerhalb klinischer Studien keine spezifische Therapiemöglichkeit gibt (KINDERMANN et al., 2012; VOS et al., 2015). Zusätzlich erschwert die große Inhomogenität der klinischen Symptomatik der Erkrankung eine eindeutige Diagnose (HUFNAGEL et al., 2000; KINDERMANN et al., 2012). Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass laut *D'Ambrosio et al.* über 20% der Myokarditis-Patienten eine DCM entwickeln können (D'AMBROSIO et al., 2001), die wiederum eine der Hauptursachen für Herztransplantationen darstellt, wird die Notwendigkeit zur Forschung an innovativen Therapiemöglichkeiten der Myokarditis deutlich.

Wie zuvor beschrieben und in Tabelle 5 zusammengefasst, gibt es bereits zahlreiche Studien über eine Rolle von MK während entzündlicher Prozesse. Welche Bedeutung MK während der Pathophysiologie der Myokarditis zukommen könnte, ist jedoch bisher nicht ausreichend beschrieben worden. Ziel dieser Arbeit ist es daher, mit Hilfe eines Mausmodells Erkenntnisse über die Bedeutung von MK während der Myokarditis zu erlangen und weiterhin mögliche Therapieoptionen aus den Folgen einer Inhibition dieses Wachstumsfaktors abzuleiten.

Daher sollen bei der vorliegenden Arbeit folgende Fragen im Vordergrund stehen:

- Kann die Inhibition von MK durch spezifische Antikörper im Mausmodell der EAM zu einer mildereren Ausprägung des Phänotyps während der akuten Phase der Erkrankung führen?
- Inwiefern wird durch die Blockade von MK das für eine Myokarditis typische zelluläre Infiltrat sowohl quantitativ als auch qualitativ beeinflusst?
- Hat eine Blockade von MK im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe auch über die akute Phase hinaus einen positiven Einfluss auf die kardiale Gesundheit, indem die Pumpfunktion weniger beeinträchtigt und die myokardiale Fibrose reduziert wird?

III. MATERIAL UND METHODEN

1. Versuchstiere

Die Tierversuche der vorliegenden Arbeit wurden an Mäusen gemäß dem Tierschutzgesetz § 7 - 9 durchgeführt und von der Regierung von Oberbayern genehmigt (AZ: 55.2-1-54-2532-48-2014). Die Behandlungen sowie die echokardiographischen Untersuchungen und Organentnahmen wurden in den für diese Experimente ausgestatteten und vorgesehenen Räumen im Forschungslabor B der Klinik und Poliklinik I der Ludwig-Maximilians-Universität München am Campus Großhadern durchgeführt.

1.1. Verwendete Versuchstiere

Alle Versuche wurden mit 8 bis 19 Wochen alten männlichen Mäusen des Stammes BALB/c durchgeführt. Die Mäuse hatten ein durchschnittliches Gewicht von 21 g bis 26 g und wurden von Charles River (Sulzfeld, Deutschland) an den Tierstall der Medizinischen Klinik und Poliklinik I geliefert. Diese Mauslinie BALB/c wurde 1913 von Halsey J. Bagg gezüchtet und daraufhin von verschiedenen Laboren zu einem Inzuchtstamm weitergezüchtet. Die im Jahr 1935 von George Davis Snell in das Jackson Laboratory überführten Tiere bildeten den Ursprung für alle heute verwendeten Mäuse dieses Stammes. Bei BALB/c-Mäusen ist es neben wenigen anderen Stämmen möglich, die EAM zu induzieren, weshalb dieser Stamm u.a. für die Versuche der vorliegenden Arbeit ausgewählt wurde.

1.2. Haltungsbedingungen

Die verwendeten Tiere wurden sieben Tage vor Versuchsbeginn von Charles River an den Tierstall der Klinik und Poliklinik I des Klinikums Großhadern geliefert und dort unter spezifisch pathogenfreien (SPF) Bedingungen gehalten. In Gruppengrößen von 2 bis 4 Tieren wurden die Mäuse in durchsichtigen, leicht zu reinigenden und zu desinfizierenden Standardkäfigen vom Typ II long gehalten. Als Einstreu wurden entkeimte, staubarme Späne verwendet. Zweimal

wöchentlich wurden die Käfige von ausgebildetem Fachpersonal gereinigt und desinfiziert. Als Rückzugsmöglichkeit diente den Mäusen pro Käfig jeweils ein Kunststoffhäuschen. Steriler Zellstoff wurde als Nistmaterial zur Verfügung gestellt, während Holzklötzchen den Tieren als Beschäftigungsmaterial dienten. Per Lichtprogramm wurden die Tiere bei einer konstanten Raumtemperatur von 23°C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von etwa 50% auf einen 12h Tag/Nacht-Rhythmus eingestellt.

2. Material

2.1. Allgemeine Chemikalien, Lösungsmittel, Medien und Peptide

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden in höchstem Reinheitsgrad bezogen. Die Markennamen der Materialien wurden nicht explizit erwähnt.

ACK Puffer	ThermoFisher, Frankfurt
Aqua ad injectabilia	B. Braun AG Melsungen, Melsungen
Aqua dest.	Millipore, Billerica, USA
BSA (bovines Serumalbumin)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Endopan 3	PAN Biotech, Aidenbach
Ethanol 96%, vergällt	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
FACS Lysing Solution	BD Bioscience, Heidelberg
Fibrinogen, human	Innovative Research, Inc., Peary Ct, USA
Fibrinogen, murine	Innovative Research, Inc., Peary Ct, USA
Formaldehyd 4%	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Hanks' Salt Solution	Biochrom GmbH, Berlin
Interleukin-8, human	PeptoTech Inc., Rocky Hill, USA
Isotone Natriumchloridlösung	B. Braun AG Melsungen, Melsungen

Liberase	Roche, Mannheim
Midkine, human	PeptoTech Inc., Rocky Hill, USA
Midkine, murin	PeptoTech Inc., Rocky Hill, USA
Natriumcitratlösung 0,11 mmol/l	Bioanalytic GmbH, Umkirch Freiburg
PBS (Phosphate Buffered Saline)	Biochrom GmbH, Berlin
Saponin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Sheath-Fluid	Beckman Coulter, Fullerton, USA
Tween	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ziegen Serum	Carl Roth GmbH, Karlsruhe

2.2. Immunisierung

CFA (Complete Freund's Adjuvant)	Sigma Aldrich, Taufkirchen
α -MyHC (Herzpeptid) (Ac-RSLKLMATLFSTYASADR-OH)	Caslo, Lyngby, Dänemark

2.3. Antikörper

Isotyp Kontrolle Maus IgG1 (Klon MOPC-21)	BioLegend, San Diego, USA
Isotyp Kontrolle Maus IgG2a (Klon MOPC-173)	BioLegend, San Diego, USA
Isotyp Kontrolle Ratte IgG1-APC-Cy7 (Klon A110-1)	BD Bioscience, Heidelberg
Isotyp Kontrolle Ratte IgG2a-AlexaFluor 488 (Klon RTK2758)	BioLegend, San Diego, USA
Isotyp Kontrolle Ratte IgG2a-PB (Klon R35-95)	BD Bioscience, Heidelberg
Isotyp Kontrolle Ratte IgG2a-PE (Klon R35-95)	BD Bioscience, Heidelberg
Isotyp Kontrolle Ratte IgG2a-Per-CP (R35-95)	BD Bioscience, Heidelberg

Isotyp Kontrolle Ratte IgG2b-PE (Klon A95-1)	BD Bioscience, Heidelberg
Isotyp Kontrolle Ratte IgG2b-Per-CP (A35-1)	BD Bioscience, Heidelberg
monoklonaler IgG Kaninchen-anti-Mensch Myeloperoxidase-Antikörper (Klon SP72)	Abcam, Cambridge, UK
monoklonaler IgG1 Maus-anti-humanes Midkine-Antikörper	Cellmid, Sydney, Australia
monoklonaler IgG1 Ratte-anti-Maus CD25-Antikörper APC-Cy7 (Klon PC61)	BD Bioscience, Heidelberg
monoklonaler IgG2a Ratte-anti-Maus CD4-Antikörper PB (RM4-5)	BD Bioscience, Heidelberg
monoklonaler IgG2a Ratte-anti-Maus CD4-Antikörper Per-CP (Klon RM4-5)	BD Bioscience, Heidelberg
monoklonaler IgG2a Ratte-anti-Maus CD127-Antikörper AlexaFluor 488 (Klon A7/R34)	BioLegend, San Diego, USA
monoklonaler IgG2a Ratte-anti-Maus Foxp3-Antikörper PE (Klon FJK-16s)	eBioscience, Frankfurt
monoklonaler IgG2a Ratte-anti-Maus Neutrophile Elastase/mELA2 (Klon 887105)	R&D Systems GmbH, Wiesbaden
monoklonaler IgG2b Ratte-anti-Maus CD11b-Antikörper PE (Klon M1-70)	BD Bioscience, Heidelberg
monoklonaler IgG2b Ratte-anti-Maus CD45-Antikörper Per-CP (Klon 30-F11)	BD Bioscience, Heidelberg
monoklonaler IgG2b Ratte-anti-Maus Gr-1-Antikörper PB (Klon RB6-8C5)	BioLegend, San Diego, USA
polyklonaler IgG Kaninchen-anti-Maus Histon H3-Antikörper	Abcam, Cambridge, UK

polyklonaler IgG Ziege-anti-Kaninchen-AlexaFluor 488 Sekundärantikörper	Abcam, Cambridge, UK
polyklonaler IgG Ziege-anti-Kaninchen-AlexaFluor 546 Sekundärantikörper	ThermoFisher, Frankfurt
polyklonaler IgG Ziege-anti-Maus-AlexaFluor 488 Sekundärantikörper	ThermoFisher, Frankfurt
polyklonaler IgG Ziege-anti-Ratte-AlexaFluor 488 Sekundärantikörper	ThermoFisher, Frankfurt

2.4. Pharmaka

Heparin-Na 2500 I	B. Braun AG Melsungen, Melsungen
Ketaminhydrochlorid (Ketamin-Inresa 5%)	Inresa, Freiburg
Xylazinhydrochlorid (Rompun 2%)	Bayer, Leverkusen
Isofluran CP	CP-Pharma, Burgdorf

2.5. Färbungen

Eosin	BD Bioscience, Heidelberg
Hämatoxylin	BD Bioscience, Heidelberg
Hoechst 33342	Life Technologies, Eugene, USA
Masson	BD Bioscience, Heidelberg
Trichrome	BD Bioscience, Heidelberg

2.6. Operationszubehör

Baktolin wash	Bode Chemie, Hamburg
Bepanthen Augen- und Nasensalbe	Roche, Grenzach-Wyhlen
Chirurgisches Operationsbesteck	FMI Föhr Medical Instruments, Seeheim

Durapore 1,25 cm x 9,1 m	3M Health Care, Neuss
Kaltlichtlampe/Quelle KL 1500 LCD	Carl Zeiss, Jena
Mehrzweckgefäß mit Schnappdeckel	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Microlance 3 Injektionskanülen (21G; 25G; 30G)	BD Bioscience, Heidelberg
OP-Mikroskop Stemi 2000-C	Carl Zeiss, Jena
Spritzen (1 ml; 2 ml; 5 ml; 10 ml)	B. Braun AG Melsungen, Melsungen
Sterilium	Bode Chemie, Hamburg
Untersuchungshandschuhe	Sempercare, Wien, Österreich

2.7. Materialien für Echokardiographie

Bepanthen Augen- und Nasensalbe	Roche, Grenzach-Wyhlen
Durapore 1,25 cm x 9,1 m	3M Health Care, Neuss
EKG Elektroden Gel	C+V Pharma-Depot, Versmold
Haarentfernungscreme	Veet, Heidelberg
Ultraschall Gel	C+V Pharma Depot, Versmold
Wattestäbchen	ISANA Rossmann, Burgwedel

2.8. Geräte und sonstige Materialien

Autoklav Varioklav Dampfsterilisation	H+P Labortechnik, Oberschleißheim
BD Falcon Cell Strainer (40µm; 70µm)	BD Bioscience, Heidelberg
Dampfkochtopf Silit Sicomatic t-plus	WMF, Geislingen
BD Falcon tubes (15ml; 50ml)	BD Bioscience, Heidelberg
Deckgläser (Stärke 1; 24x50mm)	Engelbrecht Medizin und Labortechnik
Discofix®-3 Dreiwegehähne	B. Braun AG Melsungen, Melsungen
Eppendorf Cups (1,5ml; 2ml)	Eppendorf, Hamburg

FACS (Analysegerät) Gallios	Beckman Coulter, Fullerton, USA
FACS Röhren (5 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Feinwaage CP64-0CE	Sartorius AG, Göttingen
Fluorescence Mounting Medium	DAKO, Carpinteria, USA
Heizrührer Ikamag RCT	IKA, Staufen
Kamera AxioCam MRm	Carl Zeiss, Jena
Kamera Olympus DP 72	Olympus, Center Valley, USA
Kühl-/Gefrierschrank	Liebherr, Ochsenhausen
Microscale Protein Labeling Kit	ThermoFisher, Frankfurt
Mikroskop Imager.M2	Carl Zeiss, Jena
Mikroskop Leica TCS SP8 X	Leica Microsystems CMS GmbH, Mannheim
Mikroskop Olympus BX 41	Olympus, Center Valley, USA
Mikrotom Microm HM 315	Microm International GmbH, Walldorf
Mikrotom-Klingen S35 Type	Feather, Osaka, Japan
Objekträger (76 x 26 x 1 mm)	Engelbrecht Medizin und Labortechnik GmbH, Edermünde
Petrischalen Steriplan	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Pipetten (2,5/10/20/200/1000 µl)	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
Paraffin (Spezialparaffin Histologie)	SAV Liquid Production GmbH, Flintsbach
Paraffin-Einbettssystem (TES 99)	Medite GmbH, Burgdorf
Vevo®2100 (Ultraschallgerät)	Toronto, Kanada
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, USA
Waage Scout Pro	Ohaus, Gießen
Xylol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe

Zentrifuge EBA 12R	Hettich, Bäch, Schweiz
Zentrifuge Multifuge 3 L-R	Heraeus Holding, Hanau

2.9. Software

Affinity Designer	Serif Europe Ltd., Nottingham, UK
AxioVision SE64	Carl Zeiss, Jena
FlowJo V10	TreStar, Ashland, USA
SPSS Statistics 21	IBM, Chicago, USA
Visiopharm Integrator System	Visiopharm, Hoersholm, Dänemark

3. Methoden

3.1. Versuchsaufbau

Die Induktion der Myokarditis bei entsprechend empfänglichen BALB/c-Mäusen erfolgte mittels des herzeigenen Mauspeptids α Myosin Heavy Chain (α MyHC); (Ac-RSLKLMATLFSTYASADR-OH) und des starken T-Zell-Aktivators *Complete Freund's Adjuvant* (CFA). Die Immunisierung durch α MyHC und CFA wurde an den Tagen 0 und 7 des Versuchs durch subkutane (s.c.) Injektion durchgeführt, woraufhin die Tiere bis Tag 21 eine akute Myokarditis entwickelten. Im weiteren Verlauf ging diese bis Tag 63 in eine chronische Phase über (Abb. 2).

Die Applikation der anti-Midkine-Antikörper (anti-MK) sowie der entsprechenden Isotyp-Kontrollantikörper erfolgte zweimal wöchentlich von Tag 0 bis Tag 21 durch intraperitoneale (ip) Injektion.

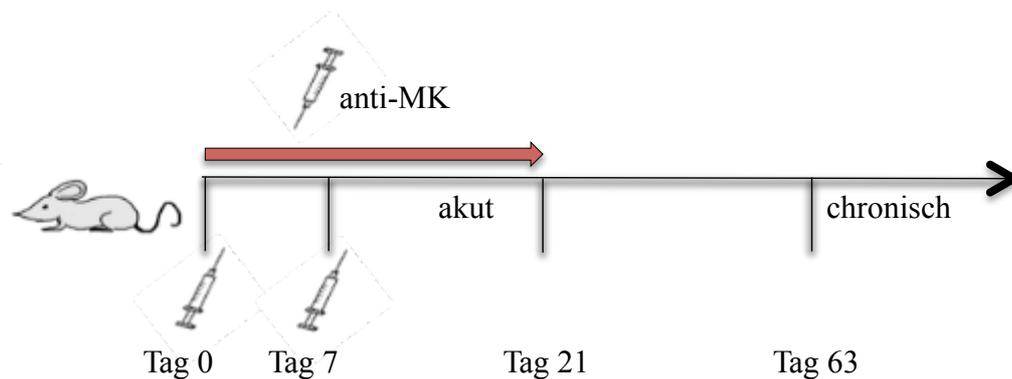


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Myokarditis-Induktion

Immunisierung der Tiere an Tag 0 und Tag 7. Applikation von anti-MK zweimal wöchentlich bis Tag 21 (Höhepunkt der Inflammation). Das chronische Stadium der Erkrankung wird an Tag 63 untersucht.

Um die Leukozyteninfiltration mittels Histologie und durchflusszytometrischer Analyse (FACS) messen zu können, wurden die Tiere an Tag 21 schmerzfrei durch Genickbruch getötet und deren Herzen anschließend entnommen.

Die in den chronischen Verlauf des Versuchsmodells eingeschlossenen Tiere wurden mit Hilfe eines speziellen Kleintierechokardiographs an Tag 63 untersucht. Danach wurden die Tiere schmerzfrei durch Genickbruch getötet, die Herzen ebenfalls entnommen und histologisch aufgearbeitet.

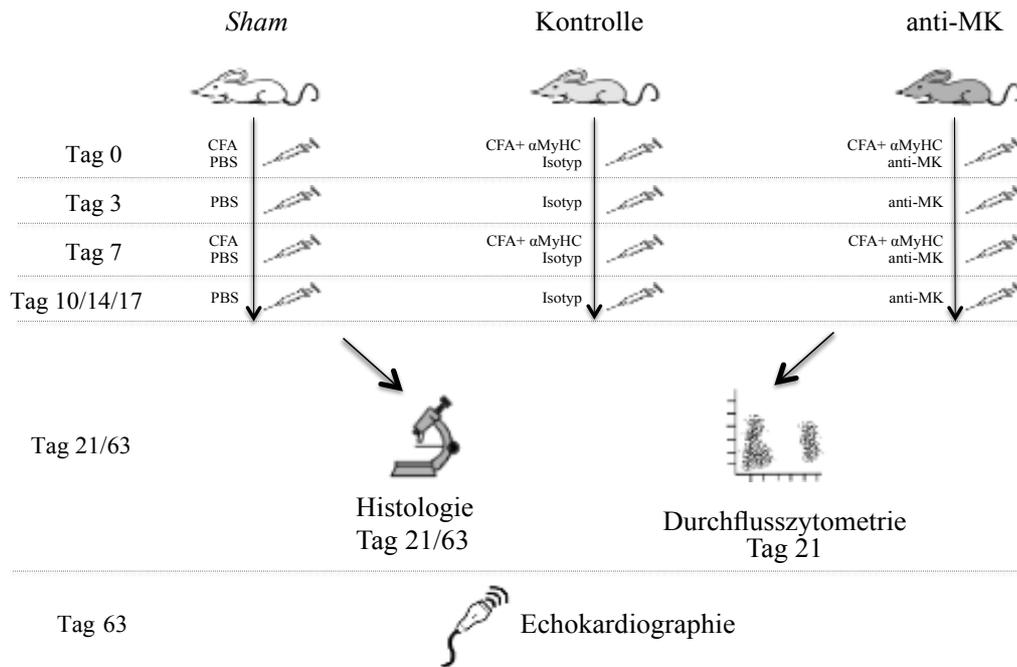


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Studiendesigns

BALB/c-Mäuse wurden an Tag 0 und Tag 7 immunisiert und zweimal wöchentlich bis Tag 21 mit einem spezifischen anti-MK-Antikörper (anti-MK) behandelt. Als Kontrolle galten entweder unbehandelte oder mit entsprechendem Isotyp-Kontrollantikörper behandelte Tiere. *Sham*-Kontrollen wurden lediglich mit CFA und nicht mit α MyHC immunisiert. Um die akute Entzündungsreaktion des Herzgewebes beurteilen zu können, wurden die Tiere an Tag 21 geopfert. Die kardiale Funktion und Fibrose wurde an Tag 63 analysiert.

3.2. Mausmodell

Für die vorliegende Arbeit wurde bei den Tieren eine Myokarditis mittels des herzeigenen Mauspeptids α MyHC und CFA induziert. Das Mausmodell der EAM ist ein international gut etabliertes Modell, das schon seit vielen Jahren von verschiedenen Forschergruppen genutzt wird, um die Pathophysiologie der Myokarditis besser verstehen zu können. Bei dieser Fragestellung spielt der gesamte Organismus eine übergeordnete Rolle, weshalb Versuche *in vitro* keine ausreichende Alternative für die Versuchsplanung darstellen.

Die Immunisierung der Tiere erfolgt bei 8 - 10 Wochen alten Tieren. Hierfür wird 1,6 mg des Herzpeptids α MyHC sorgfältig in 1,0 ml CFA gelöst und in eine 2 ml Spritze aufgezogen. Über eine zweite Spritze mit einer äquivalenten Menge PBS und einem Dreiweghahn konnten nun alle drei Substanzen möglichst ohne Lufteinschluss sorgfältig miteinander vermischt werden.

Dieses Gemisch wurde daraufhin den Mäusen gewichtsadaptiert an Tag 0 und Tag 7 des Versuchs mit einer Konzentration von 10 µl/g Körpergewicht streng subkutan in die Kniefalte injiziert. Die Immunisierung der *Sham*-Kontrolltiere erfolgte analog, um einen Phänotyp allein durch Applikation von CFA auszuschließen.

3.2.1. Komplikationen

Beim vorliegenden Versuchsaufbau kam es äußerst selten zu Komplikationen. Eine versehentliche intraperitoneale Injektion des Gemischs zur Immunisierung führt zu starken Verklebungen der injektionsnahen Organe der Bauchhöhle. In die statistische Analyse wurden nur Tiere einbezogen, bei denen der Immunisierungsprozess ohne Komplikationen verlief.

3.2.2. Antikörperbehandlung

Die Applikation der anti-MK-Antikörper (anti-MK) sowie der entsprechenden Kontrollantikörper erfolgte gewichtsadaptiert zweimal wöchentlich (10 µg/g Körpergewicht ip) von Tag 0 bis Tag 21 des Versuchs. Dabei wurden die MK-blockierenden Antikörper großzügiger Weise von CELLMID (Sydney, Australien) zur Verfügung gestellt.

3.3. Histologie

Die Mäuse wurden für die histologischen Analysen durch Genickbruch schmerzfrei getötet, der Thorax eröffnet und das Herz nach Trennung der Gefäße vorsichtig entnommen. Nach sorgfältiger, retrograder Spülung mit ca. 10 ml Natriumchloridlösung wurden die Herzen in 4%igem Paraformaldehyd (PFA) fixiert. Um das reine Herzgewicht bestimmen zu können, wurden 24 Stunden bis maximal 48 Stunden nach der Fixierung nicht unmittelbar zum Herzen gehörige Gewebereste, wie beispielsweise Lungengewebe oder der Herzbeutel, entfernt. Anschließend wurden die Herzen zur Entwässerung des Gewebes in 70%igem Ethanol eingelegt. Daraufhin konnten die Herzen im nächsten Schritt in Paraffin eingebettet und nach Abkühlen mit Hilfe eines Mikrotoms 4 µm dicke Schnitte angefertigt werden. Abschließend wurden die Proben auf einen Objektträger

aufgenommen und über Nacht bei 37°C getrocknet, bevor sie gefärbt werden konnten.

Die Anfertigung und Auswertung der histologischen Präparate wurde in Kooperationen mit dem Institut für Tierpathologie in München unter der Leitung von Herrn Dr. Andreas Parzefall sowie mit dem Zentrum für Molekulare Kardiologie (Universität Zürich) unter der Leitung von Prof. Dr. Urs Eriksson, durchgeführt.

3.3.1. Färbungen

3.3.1.1. Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin (H&E) Färbung ist die am weitesten verbreitete histologische Färbemethode. Hämatoxylin wird aus dem Blauholzbaum gewonnen und mittels Oxidation zu Hämalaun weiterverarbeitet. Hämalaun hat die Eigenschaft, basische Strukturen wie insbesondere das Chromatin der Zellkerne blau zu färben. Der Farbstoff Eosin ermöglicht die Differenzierung von Zytoplasma bis hin zu Bindegewebe und verschiedenen Zelltypen durch das Anfärben dieser Strukturen in unterschiedlichen Rosa- bis Orangetönen (BANCROFT und LAYTON, 2013).

3.3.1.2. Immunhistochemie (IHC)

Die IHC ist eine histologische Färbemethode der Medizin und Biologie, mit deren Hilfe es möglich ist, gewünschte Antigene wie beispielsweise Proteine oder andere Zellstrukturen durch markierte Antikörper sowohl auf der Zelloberfläche als auch intrazellulär sichtbar zu machen. Durch Markierung der Antikörper mittels spezieller Fluoreszenzfarbstoffe kann die Immunfluoreszenz an einem entsprechenden Fluoreszenzmikroskop beurteilt werden.

3.3.1.3. Masson-Trichrom-Färbung

Die Trichrom-Färbung nach Masson ist eine histologische Methode zur Darstellung von Bindegewebsstrukturen. Während Keratin des Muskelgewebes

typischerweise kräftig rot erscheint, werden Kollagen und Knochen in unterschiedlichen Blautönen sichtbar.

3.3.2. Bestimmung des Leukozyteninfiltrationsgrades

Der Grad der Infiltration durch inflammatorische Zellen in das Herz an Tag 21 wurde mittels eines semiquantitativen Analyseverfahrens – dem sogenannten *EAM-Score* – bestimmt. Die Analyse der verblindeten Proben wurde von unseren Kooperationspartnern aus dem Institut für Molekulare Kardiologie der Universität Zürich vorgenommen. Hierfür wurden pro Herz je 4 bis 6 H&E-gefärbte Querschnitte lichtmikroskopisch untersucht und der Grad der Infiltration bestimmt (0: keine Infiltration; 1: kleine Bereiche mit inflammatorischen Zellen zwischen Kardiomyozyten; 2: mehrere Bereiche mit >100 inflammatorischer Zellen zwischen Kardiomyozyten; 3: >10% des Herzens von inflammatorischen Zellen infiltriert; 4: >30% des Herzens von inflammatorischen Zellen infiltriert (ERIKSSON et al., 2003a; MARTY et al., 2006).

3.3.3. Bestimmung muriner NET-positiver PMN *in vitro*

Um den möglichen Einfluss von MK auf die NET-Formation zu untersuchen, wurden murine PMN isoliert und *in vitro* sowohl mit immobilisiertem MK also auch mit löslichem MK (msMK) stimuliert. Murine PMN werden aus dem Knochenmark (KM) von *Femur*, *Tibia* und *Humerus* gewonnen. Hierfür wurden die entsprechenden Knochen zunächst präpariert und die Gelenkflächen mit einem Skalpell abgetrennt. Anschließend wurde das KM mit Hilfe einer Spritze und PBS sorgfältig aus dem Knochen über ein 70 µm Zell-Sieb in ein 50 ml Falcon-Röhrchen gespült. Während die isolierten Zellen bei 300 g für 10 min zentrifugiert wurden, konnten die Percoll-Gradienten aus 4 ml 72%igem, 3 ml 64%igem und 3 ml 52%igem murinem Percoll in einem 15 ml Röhrchen hergestellt werden. Für die erfolgreiche Isolierung der Zellen war es wichtig, klare Abgrenzungen zwischen den verschiedenen Gradienten zu erkennen. Nach abgeschlossenem Zentrifugieren der KM-Zellen wurde der Überstand abgekippt und das Pellet in 2 ml PBS gelöst. Anschließend wurde die Zellsuspension vorsichtig auf die hergestellten Gradienten gegeben und für 30 min bei 4°C und 1000 g zentrifugiert. Aufgrund der spezifischen Dichte muriner PMN konnten

diese nach dem Zentrifugieren zwischen der 72%igen und der 64%igen Percoll-Phase entnommen werden. Um eine Differenzierung der unreifen Zellen des KM zu PMN zu bewirken, wurden die Zellen im Anschluss über Nacht bei 37°C und 5% CO₂ mit Interleukin-6 (IL-6) stimuliert.

Währenddessen wurden *Ibidi 8 well slides* nach folgendem Schema bei 4°C ebenfalls über Nacht beschichtet.

ibidi	mFibrinogen 100µg/ml	mMK 20µg/ml	mFibrinogen 100µg/ml + msMK 20µg/ml	
	mFibrinogen 100µg/ml	mMK 20µg/ml	mFibrinogen 100µg/ml + msMK 20µg/ml	

Abbildung 4: Schematische Darstellung der Beschichtung der *Ibidi 8 well slides* und Stimulation muriner PMN

Mit murinem Fibrinogen (mFibrinogen) und murinem MK (mMK) wurden die Kammern über Nacht bei 4°C beschichtet. Lösliches murines MK (msMK) diente erst am folgenden Tag als Stimulus.

Nach abgeschlossener Beschichtung wurden murine PMN zunächst gezählt und anschließend in Adhäsionsmedium (500 µl BSA 10%; 400 µl HEPES-Puffer; 200 µl Glukoselösung 10%; 200 µl Ca²⁺/Mg²⁺ und 18,7 ml Hanks' Puffer) aufgenommen. Auf beschichtete und sorgfältig mit PBS gewaschene *Ibidi 8 well slides* konnten nun je Kammer 3 x 10⁵ murine PMN gegeben werden. Da untersucht werden sollte, inwiefern sich die Beschichtung mit mMK und die Stimulation mit msMK unterscheiden, wurde msMK zusammen mit murinen PMN in den entsprechenden Kammern inkubiert. Nach Stimulation über 16 h wurden die Zellen im Überstand vorsichtig abgenommen und die adhärenen PMN mit 4% PFA für 5 min fixiert. Nach der Fixierung wurden die Zellen zunächst mit PBS/Tween 0,1% dreimal je 5 min gewaschen und im Anschluss mit 200µl pro Kammer Blocklösung (PBS; Ziegenserum 10%; BSA 1%) für 60 min bei Dunkelheit und Raumtemperatur inkubiert. Im nächsten Schritt wurde anti-

Histon-H3-Primärantikörper und anti-neutrophile Elastase-Antikörper je 1:200 in Blocklösung verdünnt und in einem Volumen von 200 µl pro Kammer 60 min in Dunkelheit mit fixierten PMN inkubiert. Nicht-gebundene Antikörper wurden durch anschließendes erneutes Waschen mit PBS/Tween 0,1% entfernt. Nun wurde Alexa Fluor 546-markierter *goat-anti-rabbit*-Sekundärantikörper und Alexa Fluor 488-markierter *goat-anti-rat*-Sekundärantikörper jeweils 1:200 in PBS/BSA 1% gelöst und zur Färbung in einem Volumen von 200 µl pro Kammer 45 min mit den Primärantikörpern inkubiert. Parallel zur Inkubation mit Sekundärantikörpern erfolgte die Zellkernfärbung durch Hoechst mit der Konzentration 1:1000. In einem abschließenden Waschgang mit PBS/Tween 0,1% wurden die Proben von nicht-gebundenem Sekundärantikörper befreit und mit *DAKO Fourescence Mounting* Medium und Deckgläschen versiegelt. Nach Aushärten des Mediums bei 4°C wurden die Präparate mit Hilfe eines geeigneten Fluoreszenzmikroskops untersucht.

3.3.4. Bestimmung humaner NET-positiver PMN *in vitro*

Analog zu 3.3.3. sollte durch einen *in vitro*-Versuch geprüft werden, ob die Anwesenheit von MK auch im menschlichen Organismus die Fähigkeit der NET-Formation durch PMN beeinflussen könnte. Zunächst wurden einem freiwilligen Probanden zur Isolierung humaner PMN 60 ml Blut abgenommen. Um eine Koagulation bereits während des Abnehmens zu verhindern, wurden in 20 ml Spritzen jeweils 2 ml Natriumcitratlösung 0,11 mol/l vorgelegt. Im nächsten Schritt wurde das gewonnene Vollblut in 10 ml Röhrchen überführt und anschließend 60 min bei Raumtemperatur belassen. Während dieser Sedimentationsphase wurde ein Percoll-Gradient aus 4 ml 74%igem und 3 ml 55%igem humanem Percoll hergestellt. Für eine reine Zellpopulation aus PMN ist es wichtig, dass eine klare Trennlinie zwischen den Percoll-Gradienten zu erkennen ist. Der sich durch Sedimentation gebildete Überstand konnte nun abgenommen und vorsichtig auf den Gradienten pipettiert werden. Anschließend wurde die Probe bei 2200 rpm für 20 min zentrifugiert. Aufgrund der für humane PMN spezifischen Dichte war, ähnlich wie zuvor bei murinen PMN beschrieben, eine klar abgegrenzte Zellschicht zwischen den Gradienten zu erkennen. Die so isolierten PMN wurden sorgfältig mit einer Pipette entnommen, mit PBS gewaschen, gezählt und in 1 ml Adhäsionsmedium (siehe 3.3.3.) gelöst.

Zur Untersuchung der NET-Formation wurden *Ibidi 8 well slides* vorbereitet und über Nacht bei 4°C wie folgt beschichtet:

ibidi	hFibrinogen 100µg/ml	hFibrinogen 100µg/ml + hsMK 20µg/ml	hMK 20µg/ml	IL-8 10µg/ml
	hFibrinogen 100µg/ml	hFibrinogen 100µg/ml + hsMK 20µg/ml	hMK 20µg/ml	IL-8 10µg/ml

Abbildung 5: Schematische Darstellung der Beschichtung der *Ibidi 8 well slides* und Stimulation humaner PMN

Beschichtung der Kammern mit humanem Fibrinogen (hFibrinogen), humanem MK (hMK) und Interleukin-8 (IL-8) über Nacht bei 4°C. Lösliches humanes MK (hsMK) diente erst am folgenden Tag als Stimulus.

Nach Beschichtung der Kammern über Nacht mit unterschiedlichen Stimuli wurden diese sorgfältig mit PBS gewaschen und im Anschluss darauf pro Kammer 3×10^5 frisch isolierte PMN gegeben. Um einen möglichen Unterschied des Stimulus von immobilisiertem humanem MK (hMK) und löslichem humanem MK (hsMK) in Bezug auf die NET-Formation zu untersuchen, wurde hsMK erst nach abgeschlossener Beschichtung zeitgleich mit isolierten PMN in die entsprechenden Kammern gegeben. Nach 90 min wurde der Überstand mit nicht adhärenen Zellen vorsichtig abgenommen und die in den Kammern verbleibenden PMN mit 4% PFA über 5 min fixiert. Anschließend wurden die Proben sorgfältig dreimal 5 min mit PBS/Tween 0,1% gewaschen. Im nächsten Schritt wurde in jede Kammer je 200 µl Blocklösung (PBS; Ziegenserum 10%; BSA 1%) gegeben und 60 min bei Dunkelheit inkubiert. Zuvor 1:200 verdünnter anti-MPO-Primärantikörper konnte nun gelöst in jeweils 200 µl Blocklösung in den Kammern für weitere 60 min bei Dunkelheit mit adhärenen PMN inkubiert werden. Um nicht-gebundene Antikörper zu entfernen, folgte erneut drei mal 5 min sorgfältiges Waschen mit PBS/Tween 0,1%. Daraufhin wurden die Proben mit entsprechendem in PBS/BSA 1% gelöstem, 1:200 verdünntem Alexa Fluor 488-markiertem *goat-anti-mouse*-Sekundärantikörper über 45 min gefärbt. Die

Zellkernfärbung erfolgte wie zuvor beschrieben durch Hoechst in einer Konzentration von 1:1000. Abschließend wurden die Kammern erneut mit PBS/Tween 0,1% gewaschen und mit *DAKO Fluorescence Mounting Medium* und Deckgläschen versiegelt.

Nach Trocknen des Mediums bei 4°C über Nacht konnten die Präparate mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops untersucht werden.

3.3.5. Bestimmung der myokardialen Fibrose

An Tag 63 des vorliegenden Versuchsmodells wurden die Versuchstiere schmerzlos durch Genickbruch getötet und deren Herzen entnommen, um den Grad der myokardialen Fibrose während des chronischen Stadiums der Herzmuskelentzündung bestimmen zu können. Hierfür wurden jeweils 4 bis 6 Querschnitte der Masson-Trichrom-gefärbten Herzen lichtmikroskopisch untersucht und mittels Morphometrie und dem Programm Visiopharm der relative Volumenanteil von fibrotischem Myokard berechnet. Zwei Punkteraster, die visuell über die histologischen Präparate gelegt wurden, dienten als Grundlage der Kalkulation (Abb. 4): ein grobes Raster zur Bestimmung des Anteils von Herzmuskelgewebe im gesamten Herzen ($V_{\text{Myokard/Herz}}$) und ein feines Raster zur Bestimmung des Anteils von fibrotischem Gewebe im Myokard ($V_{\text{Fibrose/Myokard}}$). Das grobe Raster umfasste hierbei 64 Kreuze pro Bildausschnitt. Kreuze, die beispielsweise auf Perikard oder in großlumigen Gefäßen zu liegen kamen, wurden hierbei nicht als Myokardanteil gezählt. Das feine Raster umfasste 900 Kreuze pro Bildausschnitt. Physiologisches Bindegewebe, wie es beispielsweise um Gefäße oder an den Herzklappen auftritt, wurde hierbei nicht als Fibrose gewertet. Mit Hilfe des Programms Visiopharm wurden zunächst alle vorhandenen Herzscheiben der entsprechenden Präparate eingegrenzt, um anschließend durch ein automatisches und randomisiertes Verfahren 50% der insgesamt erfassten Fläche zu analysieren. Daraus ergaben sich pro Herz in etwa 35 bis 40 Bildausschnitte (Abb. 6). Aus der Analyse jedes einzelnen Bildausschnittes ergab sich dadurch eine Gesamtzahl an Kreuzen für Myokard und Fibrose. Da sich das grobe und das kleine Muster in der Anzahl der Kreuze unterscheiden, musste für die Bestimmung des prozentualen Anteils der Faktor 900/64 berücksichtigt werden.

$$V\left(\frac{\text{Fibrose}}{\text{Myokard}}\right) = \frac{\text{Kreuze Fibrose}}{\text{Kreuze Myokard} \times \frac{900}{64}} \times 100$$

Der so berechnete prozentuale Anteil von Fibrose an Myokard wurde weiterhin in einen semiquantitativen *Score* zum Grad der Fibrose übertragen (0: 0-1% Fibrose; 1: 1 - 2% Fibrose; 2: 2 - 3% Fibrose; 3: 3 - 4% Fibrose; 4: 4 - 5% Fibrose; 5: >5% Fibrose).

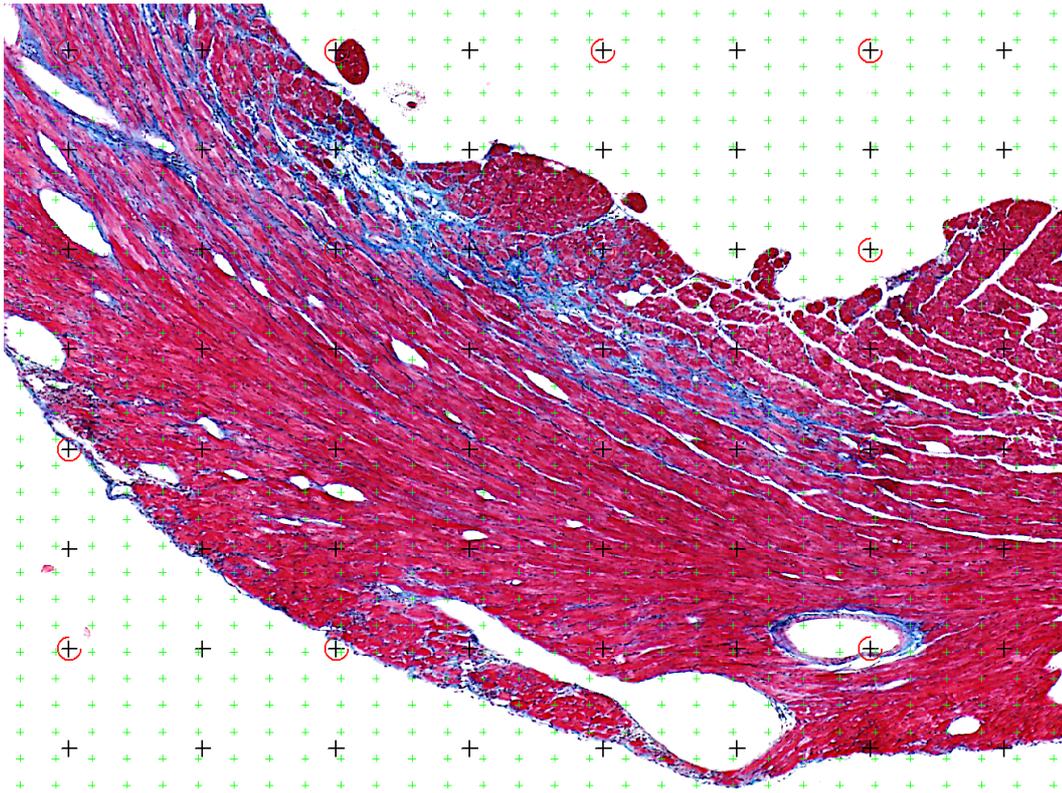


Abbildung 6: Repräsentatives Beispiel eines Bildausschnittes zur Messung der myokardialen Fibrose

Schwarze, größere Kreuze (64/Bildausschnitt) dienen der Bestimmung des Anteils von Myokard an Herzgewebe. Grüne, kleine Kreuze (900/Bildausschnitt) dienen der Beurteilung des fibrotischen Muskelgewebes im Myokard.

3.4. Durchflusszytometrie (Fluorescence Activated Cell Sorting, FACS)

3.4.1. Prinzip der FACS-Analyse

Das Prinzip der Durchflusszytometrie beruht auf der Möglichkeit, eine qualitative und quantitative Analyse von unterschiedlichsten Zelltypen und Subpopulationen anhand extrazellulärer und intrazellulärer Strukturen automatisiert durchführen zu können. Hierfür werden die spezifischen Oberflächenmoleküle und intrazellulären

Proteine der Zellen mittels Fluorochrom-konjugierter monoklonaler Antikörper markiert und so für die Analyse sichtbar gemacht. Die Zellsuspension der Probelösung wird aus einem Glasröhrchen in eine Stahlkapillare gesaugt und daraufhin im Mikrokanal einer Quarz- oder Glas-Küvette von einer zellfreien Trägerflüssigkeit umgeben. Durch starke Beschleunigung von Zellsuspension und Trägerflüssigkeit beim Eintritt in die Messkammer, liegen die Zellen hintereinander wie an einer Perlenkette aufgereiht vor und können so einzeln nacheinander von einem monochromatischen Laserstrahl der Wellenlänge 488 nm erfasst werden. Diesen Vorgang bezeichnet man als hydrodynamische Fokussierung (Abb. 7). Die Größe der erfassten Zellen kann nun mit dem Vorwärtsstreulicht (FSC = Forward Scatter), die Granularität mit dem Seitwärtsstreulicht (SSC = Sideward Scatter) ermittelt werden. Die durch den Laser angeregten Elektronen der Fluorochrome fallen im Anschluss an die Anregung wieder in ihren ursprünglichen Zustand zurück und emittieren dabei Licht in einer spezifischen Wellenlänge. Dieses Fluoreszenzlicht wird je nach technischer Ausstattung des entsprechenden Gerätes in verschiedene Intensitäten (z.B. FL1 – FL9) eingeteilt und nach elektronischer Verstärkung durch Photomultiplier und Photodetektoren erfasst (Abb. 8). Nun ist es möglich, durch Größe, Granularität und Emission die Qualität und die Quantität der Zellen in der Probelösung entsprechend zu bestimmen.

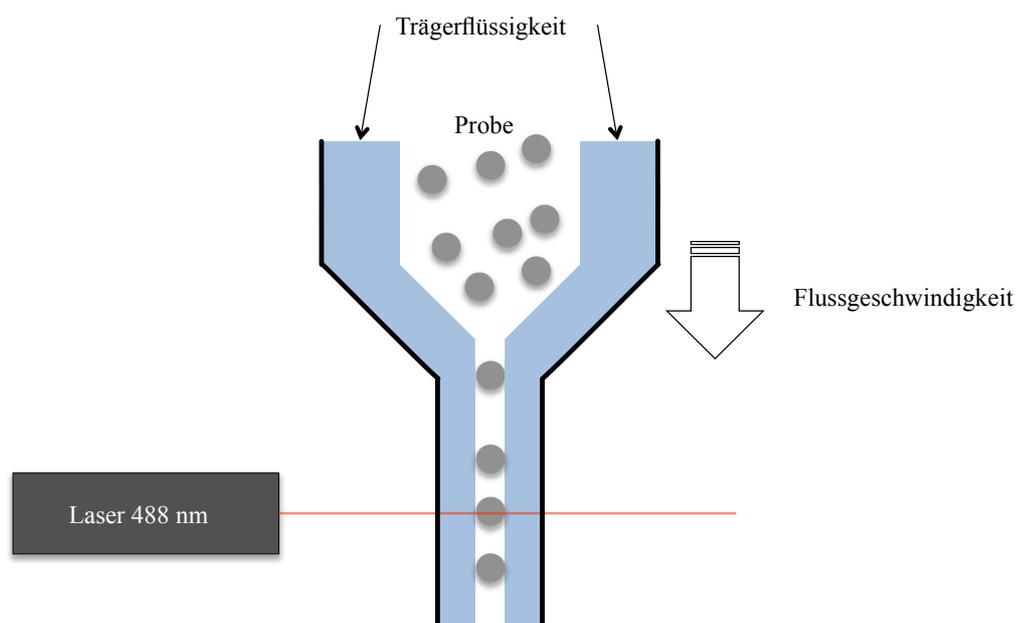


Abbildung 7: Schematische Darstellung der hydrodynamischen Fokussierung

Die Probe wird mit der Trägerflüssigkeit durch die Verjüngung so weit beschleunigt, dass der Laser die einzelnen Zellen erfassen kann.

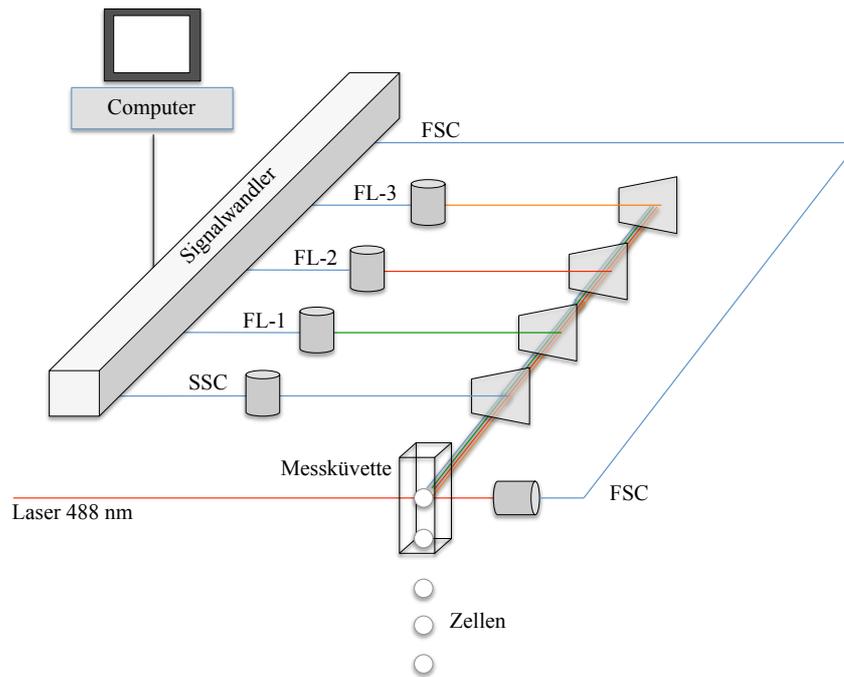


Abbildung 8: Schematische Darstellung der durchflusszytometrischen Analyse modifiziert nach (SACK et al., 2007)

Der Laser regt in der Messküvette die an Zellen gebundenen Fluorochrome an. Das daraufhin emittierte Licht wird abhängig von der Wellenlänge erfasst und über den Signalwandler als Bild auf den Monitor übertragen.

3.4.1.1. MK-Blockade *in vitro*

Für diesen Versuch wurden aus der Nabelschnur isolierte humane venöse Umbilikalvenenendothelzellen (HUVEC) bei 37°C und 5% CO₂ mit Endopan 3 Medium in einem Brutschrank kultiviert. Nach mehreren Passagen wurden die Zellen gezählt und jeweils 1×10^6 Endothelzellen in 96-well Platten mit anti-MK oder entsprechendem Isotyp IgG1 Kontrollantikörper 20 Minuten bei Raumtemperatur dunkel inkubiert.

Reines humanes MK wurde, wie im Protokoll des *Microscale Protein Labeling Kit* (ThermoFisher, A3006) vorgeschrieben, markiert. Hierfür sollte das Protein in einer Konzentration von 1 mg/ml in Natriumchloridlösung vorliegen. Die Färbung eines Proteins mit Alexa Fluor 488 ist abhängig von dessen molarer Masse (MM) und dem für diese Masse optimalen Grad der Alexa Fluor 488-Markierung. Beide Parameter bilden die sogenannte *protein molar ratio* (MR). Mit folgendem Term kann nun die benötigte Menge von Alexa Fluor 488-Stammlösung berechnet

werden.

$$\frac{[(\mu\text{g Protein}/\text{Protein MM})\times 1.000]\times MR}{11,3} = \mu\text{l Alexa Fluor 488}$$

Hierbei entspricht $\mu\text{g Protein}$ der zu markierenden eingesetzten Masse an Protein, Protein MM der molaren Masse des eingesetzten Proteins in Dalton (Da). Die MR des eingesetzten Proteins kann mit einer im Protokoll des Microscale Protein Labeling Kit enthaltenen Vergleichstabelle ermittelt werden. Für die Markierung von 50 μg MK mit dem Fluorochrom Alexa Fluor 488 gilt demnach folgender Term:

$$\frac{[(50/13.000)\times 1.000]\times 5}{11,3} = 1,70\mu\text{l Alexa Fluor 488}$$

Das in Natriumchlorid gelöste MK (50 μg in 50 μl) wurde nun mit 5 μl Natriumbicarbonatlösung sorgfältig gemischt und mit dem zuvor errechneten Volumen der Alexa Fluor 488 Stammlösung 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Zentrifugieren konnte nun das Alexa Fluor 488-markierte MK mit Hilfe eines speziellen Filtergels von ungebundenem Alexa Fluor 488 getrennt werden.

Die zuvor mit anti-MK, respektive entsprechendem Isotyp IgG1 Kontrollantikörper inkubierten HUVECs wurden im nächsten Schritt mit Alexa Fluor 488-markiertem MK für weitere 20 Minuten bei 37°C und Dunkelheit inkubiert, um anschließend in 1 ml Eppendorf-Cups überführt zu werden. Um nicht-gebundenes MK aus der Probe zu waschen, wurden die Cups mit PBS aufgefüllt und bei 2000 rpm für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das entstandene Pellet in PBs mit 1% BSA resuspendiert und unverzüglich mittels Durchflusszytometrie analysiert.

3.4.1.2. Messung inflammatorischer Zellen in den Herzen

An Tag 21 des Versuchsmodells wurden die Tiere schmerzfrei durch Genickbruch getötet, der Thorax eröffnet und die Herzen nach vorsichtiger Trennung der Gefäße entnommen. Um so viel Blut wie möglich aus dem Gefäßsystem der Herzen entfernen zu können, wurden die Herzen anschließend retrograd mit ca. 10 ml physiologischer Natriumchloridlösung gespült. Die Analyse des Herzgewebes

mittels Durchflusszytometrie stellt eine besondere Herausforderung dar, da Kardiomyozyten eine enge Verbindung untereinander und mit dem umliegenden Gewebe eingehen. Dies macht es schwierig, eine geeignete Suspension aus einzelnen Zellen zu generieren. Die Herzen wurden daher zunächst sorgfältig von nicht dem Herzen zuzuordnendem Gewebe gesäubert, mit einem Skalpell so klein wie möglich zerschnitten und daraufhin ca. 45 min bei 37°C mit Liberase 0,1% inkubiert. Die Suspension mit den so verdauten Herzen wurde im nächsten Schritt durch sorgfältiges Auf- und Abpipettieren weiter zerkleinert und im Anschluss durch ein 70 µm Zellsieb und ein 40 µm Zellsieb in 15 ml Röhrchen gefiltert. Durch das Filtern sollte erreicht werden, dass große Kardiomyozyten aussortiert werden und so in der späteren FACS-Analyse keine Probleme bereiten würden. Die erhaltene Einzelzellsuspension wurde nun mit PBS bis auf 12 ml aufgefüllt und 10 min bei 2000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgekippt, das verbliebene Zellpellet erneut in PBS resuspendiert und die Lösung in die einzelnen Cups für die Antikörperfärbung überführt. Die Zellen wurden nun für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit FITC-konjugiertem anti-CD11b, PE-konjugiertem anti-Gr-1, PerCP-konjugiertem anti-CD45 und PB-konjugiertem anti-CD4-Antikörper inkubiert. Passende Isotyp-Kontrollantikörper dienten als Kontrolle. Im letzten Schritt wurden die Zellen erneut mit PBS gewaschen, in PBS mit 1% BSA resuspendiert und unverzüglich mittels Durchflusszytometrie analysiert.

3.4.1.3. Messung von T-regulatorischen Zellen in der Milz

Um aus der Milz eine Einzelzellsuspension vorzubereiten, wurden diese zunächst mit einem Skalpell angeschnitten und mit dem Stempel einer Spritze durch ein zuvor mit PBS angefeuchtetes 40 µm Zellsieb gepresst. Erythrozyten wurden lysiert, indem die erhaltenen Zellsuspensionen zunächst mit Ammonium-Chlorid-Kalium (ACK)-Puffer für 2 Minuten inkubiert, mit PBS aufgefüllt, 5 Minuten bei 2000 rpm zentrifugiert und das so entstandene Zellpellet im Anschluss in PBS resuspendiert wurde. Die so isolierten Zellen wurden gezählt, für die Antikörperfärbung in entsprechende Cups verteilt und mit PerCP-konjugiertem anti-CD4-Antikörper und PE-konjugiertem anti-FoxP3-Antikörper inkubiert. Passende Isotyp-Antikörper dienten als Kontrolle für die Versuche. Nach beendeter Inkubation wurden die Zellen gewaschen, in PBS mit 1% BSA

resuspendiert und im direkten Anschluss mittels Durchflusszytometrie analysiert.

3.5. Echokardiographie

3.5.1. Prinzip der Echographie

Die Sonographie ist ein bildgebendes, nicht-invasives diagnostisches Mittel der inneren Medizin. Durch die Untersuchung können im lebenden Organismus u.a. die Lage und Funktion der untersuchten Organe beurteilt werden. Hierfür sendet ein Schallkopf für das menschliche Gehör nicht wahrnehmbare Schallwellen mit Frequenzen von 20 kHz bis 1 GHz in das entsprechende Gewebe aus. Für die Schallausbreitung ist der Widerstand eines Materials (Impedanz) von entscheidender Bedeutung. Durch die unterschiedlichen Impedanzen verschiedener oder inhomogener Materialien beziehungsweise Gewebearten wird der Schall an deren Grenzflächen unterschiedlich stark reflektiert. Da die Impedanz zwischen Luft und Hautoberfläche besonders stark ausgeprägt ist, muss mittels eines wasserhaltigen Gels eine direkte Verbindung zwischen dem Schallkopf und der zu untersuchenden Oberfläche hergestellt werden. So werden Lufteinschlüsse zwischen Ultraschallkopf und Gewebe vermieden. Die ausgesendeten Schallwellen werden vom Gewebe reflektiert und daraufhin wiederum vom Ultraschallkopf empfangen. Je mehr Zeit zwischen Senden und Empfangen des Signals am Schallkopf vergeht, desto weiter ist die reflektierende Struktur von der Sonde entfernt. Die Stärke der Reflexion wird auf dem Monitor des Gerätes über Graustufen dargestellt. Je heller die Struktur zu sehen ist, desto stärker ist deren Schallreflexion (Echogenität) ausgeprägt.

3.5.2. Vorbereitung und Durchführung der Untersuchung

Die für diese Arbeit vorliegenden echokardiographischen Untersuchungen wurden mit dem speziellen Kleintierechokardiograph Vevo 2100 durchgeführt. Nach Induktion der EAM durch Immunisierung und der Behandlung der Tiere mit anti-MK oder entsprechenden Kontrollantikörpern bis Tag 21, wurde der Thorax der Mäuse an Tag 63 des Versuchs mit einer Haarentfernungscreme zunächst großzügig enthaart. Hierfür wurde eine etwa erbsengroße Menge der Creme im entsprechenden Bereich mit einem Wattestäbchen vorsichtig verteilt und nach

ungefähr zwei Minuten Einwirkzeit zusammen mit den gelösten Haaren sorgfältig entfernt.

Die Untersuchung erfolgte unter Inhalationsnarkose durch Isofluran. Nach Anflutung der Narkose (3% Isofluran) in einer speziellen Box wurden die Tiere rücklinks auf eine Wärmeplatte positioniert und mit Klebestreifen fixiert. Um die Augen vor Austrocknung zu schützen, wurde Augensalbe aufgetragen. Die Aufrechterhaltung der Narkose (2% Isofluran) wurde im Folgenden bis zum Ende des Versuchs über eine Inhalationsmaske sichergestellt. Durch spezielle Elektroden auf der Wärmeplatte konnte über Elektrodengel während der Sonographie ein Elektrokardiogramm (EKG) abgeleitet werden. Außerdem wurde die Körpertemperatur der Tiere zu jeder Zeit der Untersuchung über eine Analsonde kontrolliert und stets zwischen 36 - 37°C gehalten. Nach großzügigem Auftragen des Ultraschallgels auf den enthaarten Bereich des Thorax wurden die Mäuse in der parasternalen kurzen Achse untersucht, um die Parameter Fractional Shortening (FS), Left Ventricular Ejection Fraction (LVEF) und Stroke Volume Index (SVI) berechnen zu können.



Abbildung 9: Vevo 2100

Ultraschallgerät zur Untersuchung der kardialen Funktion an Tag 63.

3.6. Statistische Analyse

Jede Gruppe wurde vor weiteren statistischen Analysen mit dem Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung, und innerhalb der Gruppen eines jeweiligen Vergleichs auf gleiche Varianzen mit dem Levene-Test, getestet. Beim Vergleich zweier Gruppen wurde der Mann-Whitney-U-Test für nicht-normalverteilte Daten sowie der Student's t-Test für unabhängige, normverteilte Stichproben eingesetzt. Beim Vergleich von mehr als zwei Gruppen untereinander wurde eine Univarianz-Analyse mit anschließendem Post Hoc Tukey's b test vorgenommen.

IV. ERGEBNISSE

1. MK-Blockade

Die Möglichkeit, MK mittels eines spezifischen Antikörpers gegen MK (anti-MK) blockieren zu können, stellt eines der grundlegenden Elemente der vorliegenden Arbeit dar und ist Voraussetzung für die Beurteilung der Bedeutung von MK während der Myokarditis im Modell der EAM. Mittels Durchflusszytometrie konnte gezeigt werden, dass anti-MK im Vergleich zu Isotyp IgG1-Kontrollantikörper (Kontrolle) die Bindung von Alexa Fluor 488-markiertem humanem MK an HUVECs signifikant reduzierte (Abb. 10, 58,2 +/- 4,9 vs. 98,2 +/- 1,0, $p < 0,001$).

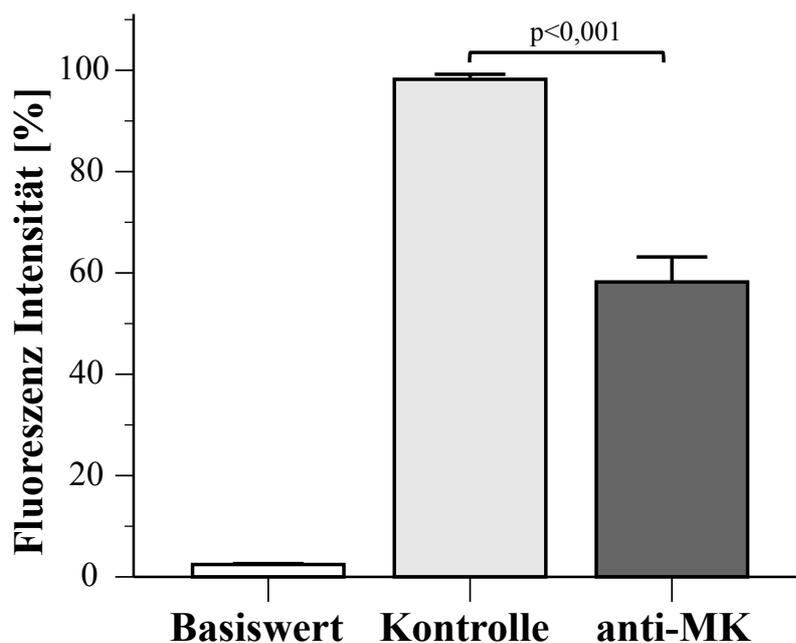


Abbildung 10: anti-MK reduziert MK-Bindung an Endothelzellen

Alexa Fluor 488-markiertes humanes MK bindet nach Inkubation mit IgG1-Kontrollantikörper (Kontrolle) an HUVECs. Durch Inkubation von MK mit anti-MK-AK (anti-MK) wird die Bindung signifikant reduziert. Als Negativkontrolle dienten Endothelzellen ohne Alexa Fluor 488-markiertes MK (Basiswert). $n = 6$; Werte von $p < 0,05$ wurden als statistisch signifikant erachtet.

2. Ergebnisse der akuten Phase

2.1. Histologie (H&E)

Da zu diesem Zeitpunkt ein Maximum an Inflammation zu erwarten ist, und somit auch ein Maximum an zellulärem Infiltrat beobachtet werden kann, wurden die Herzen der Versuchstiere an Tag 21 des Versuchs entnommen.

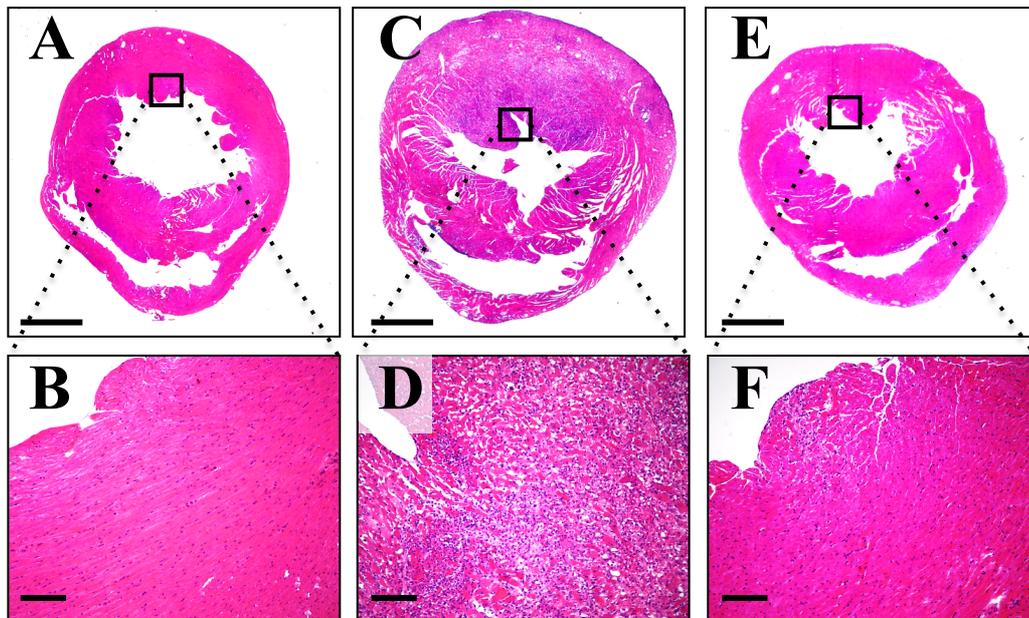


Abbildung 11: Die Blockade von MK verringert den Grad der Leukozyteninfiltration

Repräsentative H&E-gefärbte Querschnitte des Herzgewebes an Tag 21, sowohl der Kontrollgruppen aus *Sham*-immunisierten Mäusen (A, B) und immunisierten/unbehandelten Mäusen (C, D) als auch der Gruppe aus immunisierter/anti-MK behandelte Tiere (E, F). n = 10 für *Sham*-immunisierte Mäuse; n = 25 für die immunisierte/unbehandelte Kontrollgruppe und die immunisierte/anti-MK behandelte Gruppe. Referenzbalken entsprechen 1 mm in der Übersichtsaufnahme und 100 µm in der Vergrößerung.

2.1.1. EAM-Score

Der EAM-Score ist ein semiquantitatives Analyseverfahren, mit dessen Hilfe der Grad der Infiltration durch Leukozyten in das Herzgewebe beurteilt werden kann. Um den Einfluss von MK auf diesen Prozess untersuchen zu können, wurden sowohl Herzen der *Sham*-immunisierten Tiere (Abb. 11 A, B) als auch der vollständig immunisierten Tiere ohne (Abb. 11 C, D) und mit Behandlung durch anti-MK (Abb. 11 E, F) analysiert. Hierbei dienten die Tiere der *Sham*-Gruppe als Negativkontrolle und die unbehandelten Tiere als erkrankte Kontrollgruppe.

Durch H&E-Färbung der Präparate konnte die leukozytäre Infiltration in das Herzmuskelgewebe deutlich sichtbar gemacht werden. Wie bereits erwartet, wiesen immunisierte/unbehandelte Tiere im Vergleich zu *Sham*-immunisierten Tieren eine deutliche Leukozyteninfiltration auf (Abb. 12: 2,5 +/- 0,3 vs. 0,2 +/- 0,1; $p < 0,001$). Der optische Eindruck, dass durch die Blockade von MK durch anti-MK im Vergleich zur immunisierten/unbehandelten Gruppe eine Verringerung des Infiltrationsgrades in den Herzen bewirkt werden konnte, wurde durch den EAM-Score bestätigt (Abb. 12: 1,4 +/- 0,3 vs. 2,5 +/- 0,3; $p < 0,01$). Die Ergebnisse legen nahe, dass MK für die Leukozyteninfiltration während des Entzündungsprozesses von Bedeutung sein könnte.

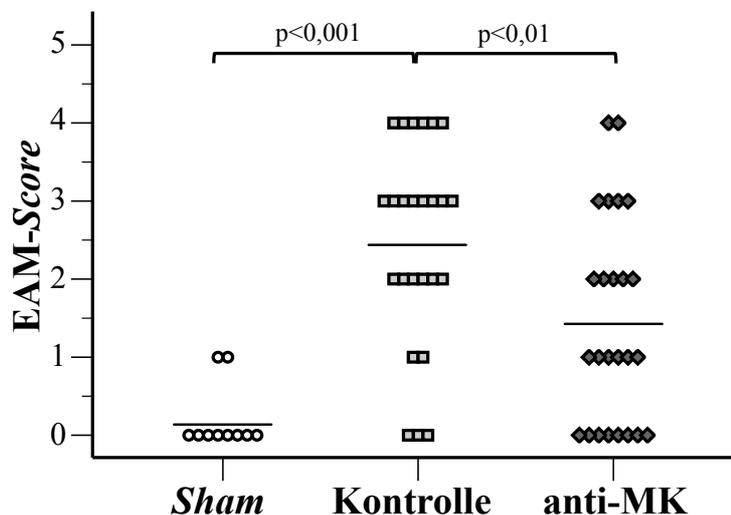


Abbildung 12: Die Blockade von MK reduziert den EAM-Score deutlich

Die semiquantitative Analyse der experimentellen Autoimmunmyokarditis (EAM) mittels EAM-Score zeigt die deutlich erhöhte kardiale Entzündung immunisierter/unbehandelter Kontrolltiere (Kontrolle) im Vergleich zu *Sham*-immunisierten Tieren (*Sham*). Die Therapie mit anti-MK von Tag 0 bis Tag 21 führt zu einem signifikant reduzierten EAM-Score der entsprechenden Herzen (anti-MK). Einzelne Punkte repräsentieren individuelle Tiere. Zur Veranschaulichung repräsentieren Querbalken die jeweiligen Mittelwerte innerhalb der Gruppen. $n = 10$ für *Sham*-immunisierte Mäuse; $n = 25$ für die immunisierte/unbehandelte Kontrollgruppe und die immunisierte/anti-MK behandelte Gruppe. Werte von $p < 0,05$ wurden als statistisch signifikant erachtet.

2.1.2. Verhältnis Herz-/Körpergewicht

Die im EAM-Score beschriebenen Ergebnisse gehen einher mit dem jeweils erhobenen Verhältnis von Herzgewicht zu Körpergewicht der betroffenen

Versuchstiere (Abb. 13). Es wurde bereits zuvor beschrieben, dass dieser Parameter einen Maßstab für die kompensatorische Hypertrophie der Herzen darstellt (STULL et al., 2000). Immunisierte/anti-MK behandelte Tiere zeigten im Vergleich zu immunisierten/unbehandelten Tieren ein signifikant reduziertes Verhältnis von Herzgewicht zu Körpergewicht (Abb. 13: $0,64 \pm 0,03$ vs. $0,74 \pm 0,02$; $p < 0,05$). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass es zwischen immunisierten/anti-MK behandelten Tieren und der *Sham*-Kontrollgruppe keinen statistisch signifikanten Unterschied gab (Abb. 13: $0,64 \pm 0,03$ vs. $0,56 \pm 0,01$; $p = 0,280$).

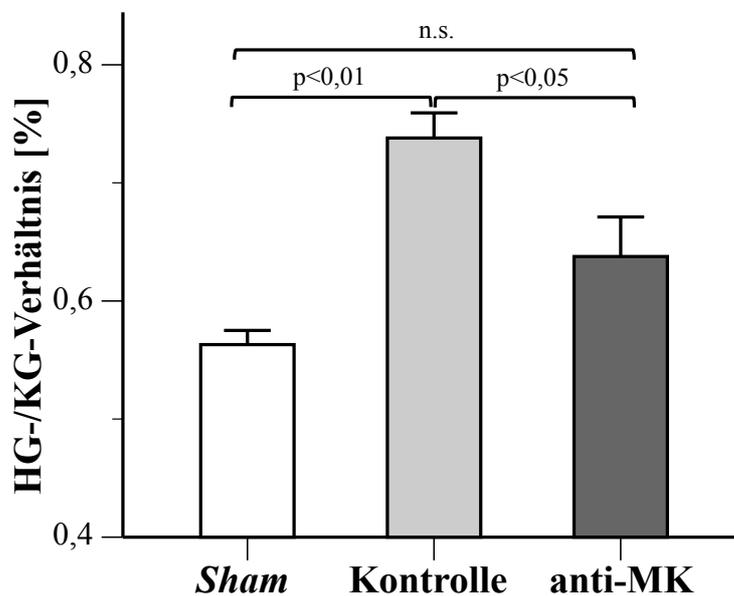


Abbildung 13: Die Blockade von MK normalisiert Herz-/Körpergewicht-Verhältnis

Durch die Immunisierung kommt es zu einem deutlichen Anstieg des Verhältnisses von Herz- zu Körpergewicht (Kontrolle). Dieses Verhältnis wird bei immunisierten/anti-MK behandelten Tieren (anti-MK) im Vergleich zur Kontrolle signifikant reduziert. Durch die anti-MK-Therapie kann kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der anti-MK-Gruppe und *Sham*-Kontrolltieren (*Sham*) festgestellt werden. $n = 10$ für *Sham*-immunisierte Mäuse; $n = 25$ für die immunisierte/unbehandelte Kontrollgruppe und die immunisierte/anti-MK behandelte Gruppe. Werte von $p < 0,05$ wurden als statistisch signifikant erachtet. n.s. = nicht signifikant.

2.2. Durchflusszytometrie

Da die H&E-gefärbten, histologischen Präparate lediglich Aufschluss über die absolute Menge an Infiltrat durch inflammatorische Zellen geben können, wurden

verdaute Herzen an Tag 21 des Versuchs zusätzlich mittels durchflusszytometrischer Analyse evaluiert. Abbildung 14 zeigt ein repräsentatives Beispiel der Gating-Strategie während der Analyse.

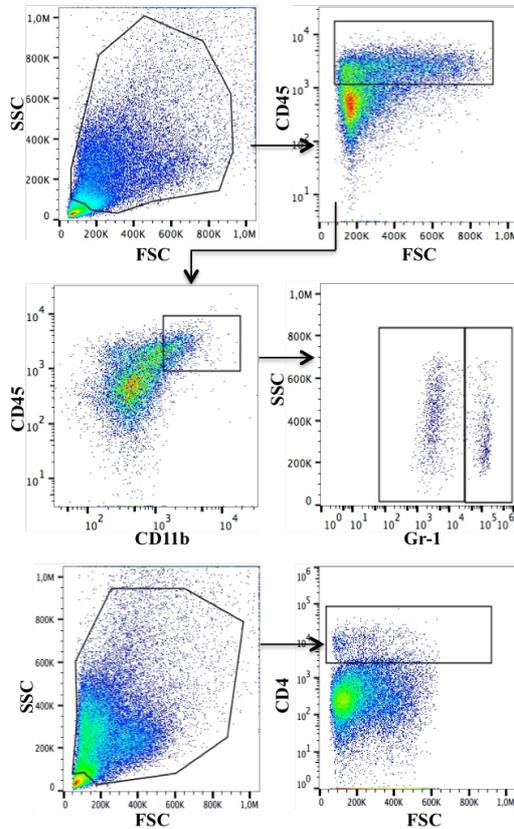


Abbildung 14: Gating-Strategie

Zunächst wurden mit Hilfe von Forward Scatter (FSC) und Side Scatter (SSC) die für die Analyse relevanten Zellpopulationen eingeschlossen. Erythrozyten, Kardiomyozyten und Zellfragmente sollten dadurch weitestgehend ausgeschlossen werden. Pfeile illustrieren die weitere Unterteilung der Lymphozyten (CD45+) und deren Subpopulationen neutrophile Granulozyten (CD45+/CD11b+/Gr-1+) und Monozyten/Makrophagen (CD45+/CD11b+/Gr-1-). Zusätzlich wurde die Menge an T-Helferzellen (CD4+) in den Herzen bestimmt.

2.2.1. FACS-Analyse des inflammatorisch veränderten Herzens

2.2.1.1. CD45+ Zellen

Wie nach den Ergebnissen des EAM-Scores in der Histologie bereits zu erwarten war, konnte auch in der FACS-Analyse gezeigt werden, dass die Gabe von anti-MK im Vergleich zu Isotyp IgG1-behandelten Kontrolltieren zu einer signifikanten Verringerung der in die Herzen eingewanderten CD45+ Zellen führte (Abb. 15: $2,1 \pm 0,42$ vs. $5,3 \pm 0,76$; $p < 0,001$).

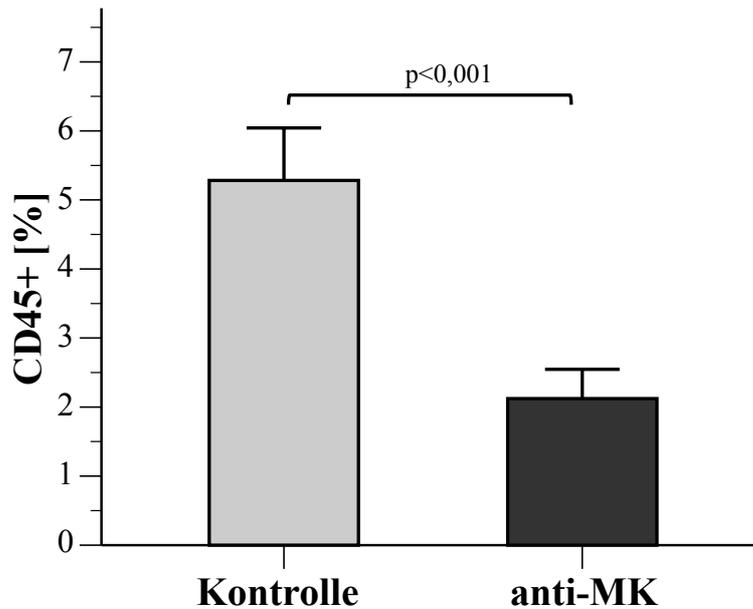


Abbildung 15: anti-MK reduziert Leukozyteninfiltration

Immunisierte/anti-MK behandelte Tiere (anti-MK) weisen einen signifikant reduzierten prozentualen Anteil von CD45+ Zellen im Vergleich zu immunisierten/Isotyp IgG1 behandelten Mäusen (Kontrolle) auf. $n = 18$; Werte von $p < 0,05$ wurden als statistisch signifikant erachtet.

2.2.1.2. CD45+/CD11b+/Gr-1+ Zellen

Die Blockade von MK führte im Vergleich zu Isotyp IgG1-behandelten Kontrolltieren weiterhin zu einer signifikanten Verringerung der CD45+/CD11b+/Gr-1+ in das Herz eingewanderten Zellen (Abb. 16: $0,2 \pm 0,04$ vs. $0,8 \pm 0,28$; $p < 0,05$). Diese Reduktion deutet darauf hin, dass die MK-Blockade in diesem Modell möglicherweise einen Einfluss auf die Rekrutierung von PMN während des akuten Entzündungsprozesses hat.

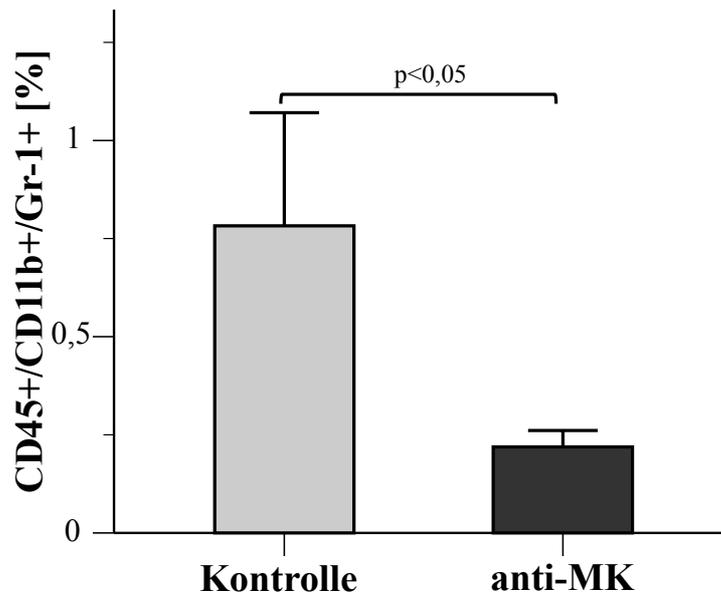


Abbildung 16: anti-MK reduziert Infiltration durch PMN

Immunisierte/anti-MK behandelte Tiere (anti-MK) weisen einen signifikant reduzierten prozentualen Anteil von CD45+/CD11b+/Gr-1+ Zellen im Vergleich zu immunisierten/Isotyp behandelten Mäusen (Kontrolle) auf. $n = 18$; Werte von $p < 0,05$ wurden als statistisch signifikant erachtet.

2.2.1.3. CD45+/CD11b+/Gr-1- Zellen

Die hauptsächlich aus Monozyten und Makrophagen bestehende Zellpopulation der CD45+/CD11b+/Gr-1- Zellen wurde durch die Blockade von MK nicht statistisch verändert. Zwar weisen die Herzen der immunisierten/anti-MK behandelten Tiere im Gegensatz zu den immunisierten/Isotyp IgG1 behandelten Kontrolltieren einen deutlichen Trend zur Reduktion dieser Population auf, signifikant ist der Unterschied allerdings nicht (Abb. 17: $1,4 \pm 0,29$ vs. $1,8 \pm 0,41$; $p = 0,14$).

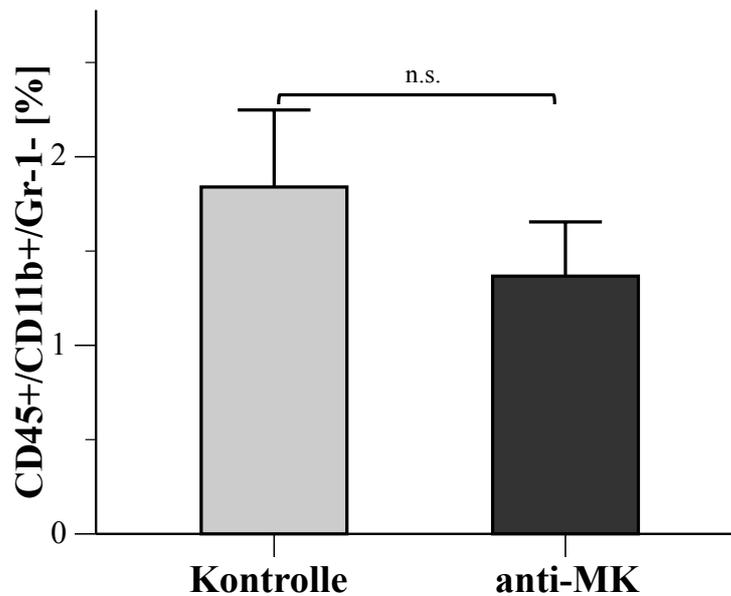


Abbildung 17: anti-MK reduziert Infiltration von Monozyten/Makrophagen nicht signifikant

Immunisierte/anti-MK behandelte Tiere (anti-MK) weisen einen Trend zur Reduktion des prozentualen Anteils von CD45+/CD11b+/Gr-1- Zellen im Vergleich zu immunisierten/Isotyp IgG1 behandelten Mäusen (Kontrolle) auf. $n = 18$; Werte von $p < 0,05$ wurden als statistisch signifikant erachtet. n.s. = nicht signifikant.

2.2.1.4. CD4+ Zellen

Weiterhin konnte mittels FACS-Analyse gezeigt werden, dass die Blockade von MK die Menge an CD4+ Zellen im Herzen verringert. Beim Vergleich der immunisierten/anti-MK behandelten Tiere mit immunisierten/Isotyp IgG1 behandelten Kontrolltieren wurde diese Zellpopulation signifikant reduziert (Abb. 18: $1,0 \pm 0,07$ vs. $1,9 \pm 0,23$; $p < 0,01$). Dieses Ergebnis legt nahe, dass MK einen direkten Einfluss auf die Rekrutierung und Einwanderung in das Gewebe von T-Helferzellen hat.

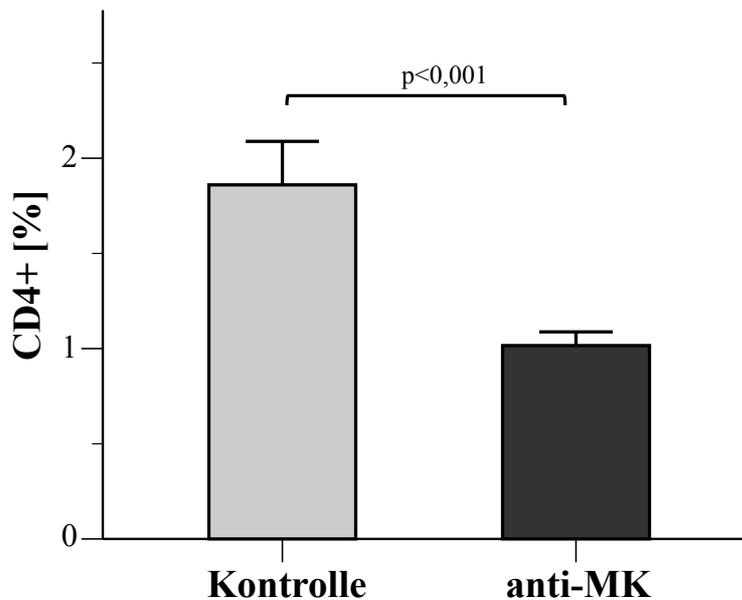


Abbildung 18: anti-MK reduziert Infiltration von T-Helferzellen

Immunisierte/anti-MK behandelte Tiere (anti-MK) weisen einen signifikant reduzierten prozentualen Anteil von CD4+ Zellen im Vergleich zu immunisierten/Isotyp behandelten Mäusen (Kontrolle) auf. $n = 18$; Werte von $p < 0,05$ wurden als statistisch signifikant erachtet.

2.2.2. FACS-Analyse Milz

2.2.2.1. T-regulatorische Zellen (Treg)

Um die Bedeutung von MK auf die Rekrutierung von Treg-Zellen zu untersuchen, wurde die Milz der Versuchstiere an Tag 21 entnommen und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Sowohl die Lymphozytenpopulation der Milz, die mittels Forward Scatter (FSC) und Side Scatter (SSC) identifiziert wurden, als auch die CD4+ Zellpopulationen zeigten sich durch die Blockade von MK unverändert (Abb. 19A: $66 \pm 2,1$ vs. $64 \pm 2,3$; $p = 0,476$; Abb. 19B: $69 \pm 0,6$ vs. $67 \pm 2,0$; $p = 0,899$). Zwar wiesen die Tiere durch Blockade von MK signifikant höhere Werte von Treg-Zellen im Vergleich zu Isotyp IgG1-behandelten Tieren auf (Abb. 19C: $19,6 \pm 0,4$ vs. $18,0 \pm 0,6$; $p = 0,018$), da dieser Effekt jedoch relativ gering ist, scheint eine Erklärung des ausgeprägten Phänotyps durch Beeinflussung der Treg-Population durch anti-MK als eher unwahrscheinlich.

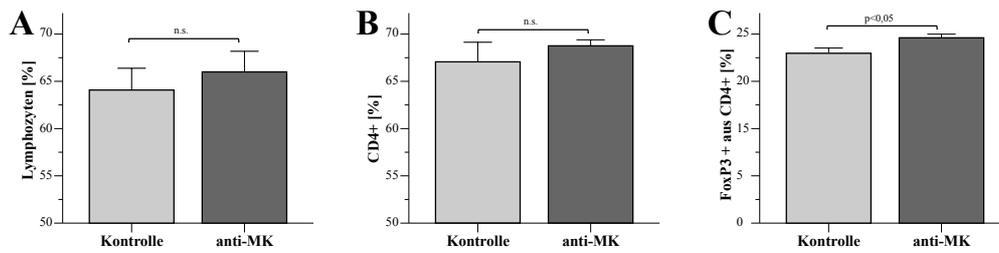


Abbildung 19: Die Blockade von MK hat keinen hinreichenden Einfluss auf die Leukozytenexpansion in der Milz

(A) Mit Hilfe von FSC/SSC der Durchflusszytometrie ermittelter prozentuale Anteil der Lymphozyten in der Milz von immunisierten/Isotyp IgG1 behandelten Kontrolltieren (Kontrolle) und immunisierten/anti-MK behandelten Tieren (anti-MK) an Tag 21 der induzierten Myokarditis. (B) Subpopulation der T-Helferzellen (CD4+) sowie (C) T-regulatorischer Zellen (FoxP3+/CD4+). n = 18; Werte von $p < 0,05$ wurden als statistisch signifikant erachtet. n.s. = nicht signifikant.

2.3. NET-Formation

2.3.1. Immunfluoreszenz *in vitro*

In Abschnitt 2.2.1.2. wurde gezeigt, dass die Blockade von MK mit einer signifikanten Reduktion von PMN im Myokard einhergeht. Ob die Fähigkeit der NET-Formation durch PMN möglicherweise ein von MK beeinflusster Mechanismus ist, sollte weiterhin mit Hilfe von *in vitro*-Versuchen mit murinen und humanen PMN untersucht werden. Zusätzlich war es interessant zu untersuchen, inwiefern Unterschiede zwischen der Stimulation durch immobilisiertes und lösliches MK bestehen.

2.3.1.1. NET-Formation muriner PMN

In diesem Versuch konnte gezeigt werden, dass murines immobilisiertes MK ein möglicher Stimulus für die NET-Formation sein könnte. Wie zu erwarten war, zeigte die mit murinem Fibrinogen beschichtete Negativkontrolle keinerlei Anzeichen von NETs (Abb. 20: mFibrinogen). Die Beschichtung der *Ibidi 8 well slides* mit murinem MK führte hingegen zu einer ausgeprägten NET-Formation der PMN (Abb. 20: mMK), während zusätzlich dargestellt werden konnte, dass die PMN-Stimulation durch murines lösliches MK bemerkenswerterweise keinen Einfluss auf diesen Prozess zu haben scheint (Abb. 20: msMK).

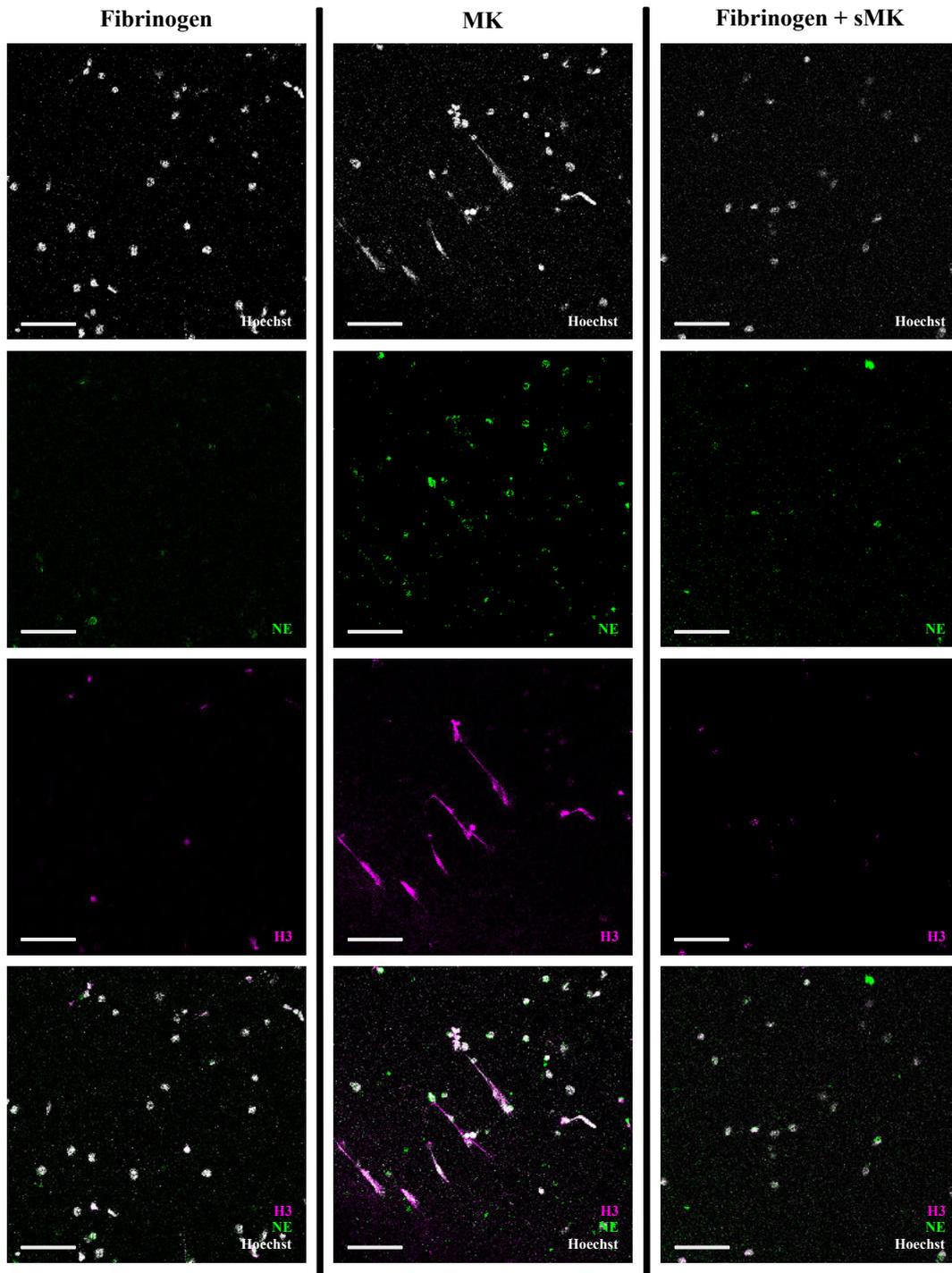


Abbildung 20: MK stimuliert murine PMN und fördert NET-Formation

Immunfluoreszenz-Färbung des Histon-H3 (H3; magenta), der neutrophilen Elastase (NE; grün) und der Zellkerne (Hoechst; grau) von murinen PMN nach Beschichtung/Stimulation mit murinem Fibrinogen (mFibrinogen), murinem immobilisiertem MK (mMK) und murinem Fibrinogen mit löslichem murinen MK (Fibrinogen + smMK). Zu sehen sind die jeweiligen Einfärbungen Hoechst, NE, H3 sowie ein entsprechend überlagertes Gesamtbild. Stimulation über 16 h. Referenzbalken entsprechen jeweils 50 μm .

2.3.1.2. NET-Formation humaner PMN

In 2.3.1.1. konnte dargestellt werden, dass MK im murinen System einen Einfluss auf die NET-Formation der PMN haben kann. Inwiefern diese Beobachtung auf den menschlichen Organismus übertragbar ist, sollte durch einen analogen Versuchsaufbau mit humanen PMN untersucht werden. Als Negativkontrolle sollten PMN auf humanem Fibrinogen dienen. Wie bereits bei murinen PMN zu sehen, kommt es hier ohne fehlenden Stimulus nicht zur NET-Formation (Abb. 21: hFibrinogen). Auch durch zusätzliche Stimulation mit löslichem humanem MK (hsMK) auf humanem Fibrinogen konnte keine NET-Formation beobachtet werden (Abb. 21: hFibrinogen + hsMK). Durch Beschichtung der Kammern mit hMK, und somit durch Immobilisation des Wachstumsfaktors kam es jedoch wie auch beim murinen Versuch beobachtet zu einer deutlich ausgeprägten NET-Formation der PMN (Abb. 21: hMK). Auch bei der mit Interleukin-8 (IL-8) beschichteten Positivkontrolle ist diese spezielle Form des Zelltodes der PMN eindeutig zu erkennen (Abb. 21: IL-8).

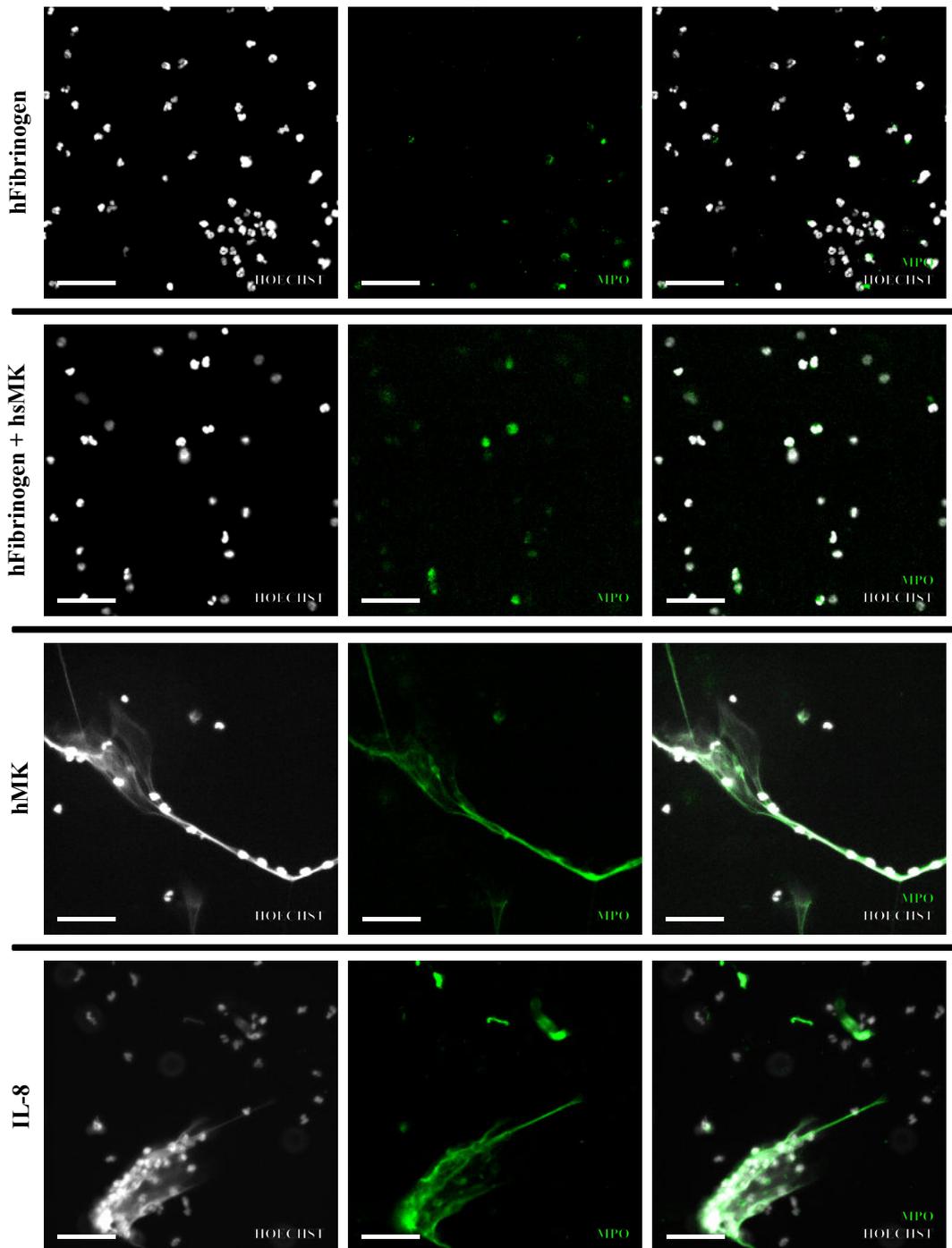


Abbildung 21: MK stimuliert PMN und fördert NET-Formation

Immunfluoreszenz-Färbung der Myeloperoxidase (MPO; grün) und der Zellkerne (Hoechst; grau) von humanen PMN nach Beschichtung/Stimulation mit humanem Fibrinogen (Fibrinogen), humanem Fibrinogen und löslichem MK (Fibrinogen + sMK), humanem immobilisiertem MK (MK) und Interleukin-8 (IL-8). Zu sehen sind die jeweiligen Einzelfärbungen Hoechst und MPO sowie ein entsprechend überlagertes Gesamtbild. Stimulation über 60 min. Referenzbalken entsprechen jeweils 50 μm .

3. Ergebnisse der chronischen Phase

Tag 63 dient in diesem Modell als definierter Zeitpunkt zur Untersuchung des chronischen Verlaufs der Myokarditis nach Immunisierung der Tiere. Mit den Ergebnissen von Tag 21 konnte gezeigt werden, dass die Blockade von MK die Leukozyteninfiltration in das Myokard der Versuchstiere verringert und somit den Phänotyp der Myokarditis im akuten Stadium abschwächt. Wie sich diese verringerte Leukozyteninfiltration durch Blockade von MK im weiteren Verlauf des Versuchsmodells auswirkt und ob daraus auch im chronischen Stadium eine Abschwächung des Phänotyps resultieren kann, sollte im Folgenden mittels Echokardiographie und erneuter histologischer Untersuchung der Herzen beurteilt werden.

3.1. Echokardiographie

Mit Hilfe des speziellen Kleintierechokardiographen (Vevo 2100) wurden die Versuchstiere in der parasternalen kurzen Achse transthorakal sonographiert. So sollte die kardiale Funktion bezugnehmend auf die Parameter *Fractional Shortening* (FS), *Left Ventricular Ejection Fraction* (LVEF) und *Stroke Volume Index* (SVI) bestimmt werden. Diese wurden im *M-Mode* anhand der systolischen und diastolischen Diameter errechnet (Abb. 22).

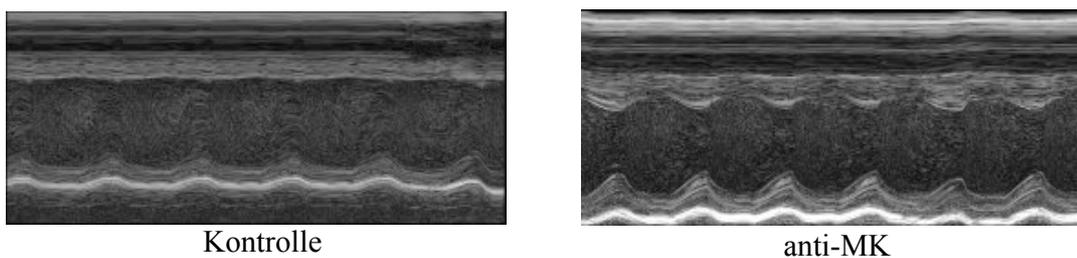


Abbildung 22: anti-MK-Behandlung reduziert kardiale Dysfunktion

An Tag 63 nach Induzieren der Myokarditis wurde an den Tieren mittels Vevo 2100 eine echokardiographische Untersuchung durchgeführt. Die Abbildung zeigt repräsentative Aufnahmen der jeweiligen Gruppen immunisiert/Isotyp IgG1 behandelt (Kontrolle) und immunisiert/anti-MK behandelt (anti-MK) in der kurzen parasternalen Achse der Herzen im M-Mode.

3.1.1. Fractional Shortening (FS)

FS beschreibt den prozentualen Wert, um den sich der enddiastolische Durchmesser des linken Ventrikels während der Systole verkürzt, und kann somit Aufschlüsse über die Pumpfunktion der Herzen geben. Wir konnten zeigen, dass die Blockade von MK eine signifikante weniger stark ausgeprägte Dysfunktion der Herzen bewirkt. Die immunisierte/anti-MK behandelte Gruppe zeigte im Vergleich zur immunisierten/Isotyp IgG1 behandelten Kontrollgruppe signifikant bessere Werte des FS (Abb. 23 A: 28 ± 1 vs. 24 ± 1 ; $p < 0,05$).

3.1.2. Left Ventricular Ejection Fraction (LVEF)

Die LVEF beschreibt den prozentualen Anteil an Blut im Herzen, der bei jeder Systole aus dem linken Ventrikel in das Gefäßsystem des Körpers gepumpt wird. Damit ist die LVEF ein wichtiger Parameter für die kardiale Funktion. Auch hier zeigte sich durch die Blockade von MK eine Veränderung des Phänotyps. Die immunisierte/anti-MK behandelte Gruppe profitiert im Vergleich zur immunisierten/Isotyp IgG1 behandelten Kontrollgruppe signifikant (Abb. 23 B: 54 ± 2 vs. 49 ± 2 ; $p < 0,05$).

3.1.3. Stroke Volume Index (SVI)

Der SVI beschreibt die absolut ausgeworfene Menge Blut während der Systole pro Gramm Körpergewicht. Die Tiere der immunisierten/anti-MK behandelten Gruppe zeigten signifikant bessere Werte auch im Hinblick auf diesen Parameter im Vergleich zu immunisierten/Isotyp IgG1 behandelten Kontrolltieren (Abb. 23 C: $1,4 \pm 0,04$ vs. $1,3 \pm 0,05$; $p < 0,05$).

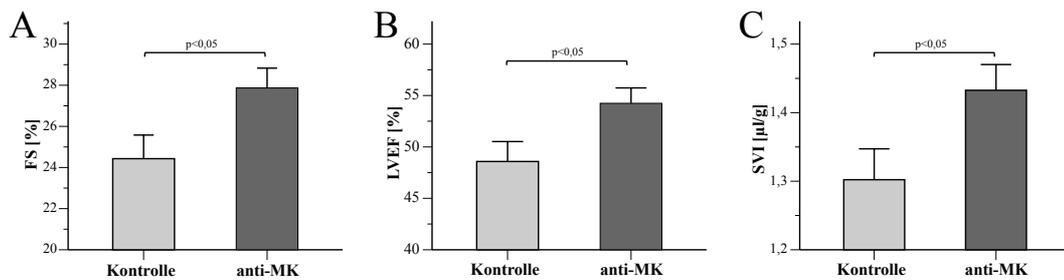


Abbildung 23: Die Blockade von MK mildert kardiale Dysfunktion

Durch die anti-MK-Behandlung (anti-MK) zeigten die Tiere bei den Parametern (A) FS, (B) LVEF und (C) SVI im Vergleich zu immunisierten/Isotyp IgG1 behandelten Kontrolltieren (Kontrolle) signifikant weniger Beeinträchtigung. $n = 25$; Werte von $p < 0,05$ wurden als statistisch signifikant erachtet.

3.2. Histologie

Mittels Echokardiographie konnte gezeigt werden, dass die Versuchstiere im Verlauf der EAM ausgeprägte Defizite in der kardialen Funktion aufweisen und diese Defizite durch die Blockade von MK signifikant reduziert werden konnten. Da davon ausgegangen wird, dass diese Ergebnisse in direktem Zusammenhang mit dem Grad der myokardialen Fibrose der Herzen stehen, wurden die Herzen der Versuchstiere nach Beendigung der Echokardiographie und nach schmerzfreier Tötung durch Genickbruch in Narkose entnommen und histologisch aufgearbeitet (Abb. 24). Neben der immunisierten/Isotyp behandelten Gruppe (Abb. 24 C, D) und der immunisierten/anti-MK behandelten Gruppe (Abb. 24 E, F) wurde eine zusätzliche Kontrollgruppe *Sham*-immunisierter Tiere (Abb. 24 A, B) verwendet. So sollte eine durch CFA ausgelöste myokardiale Fibrose ausgeschlossen werden.

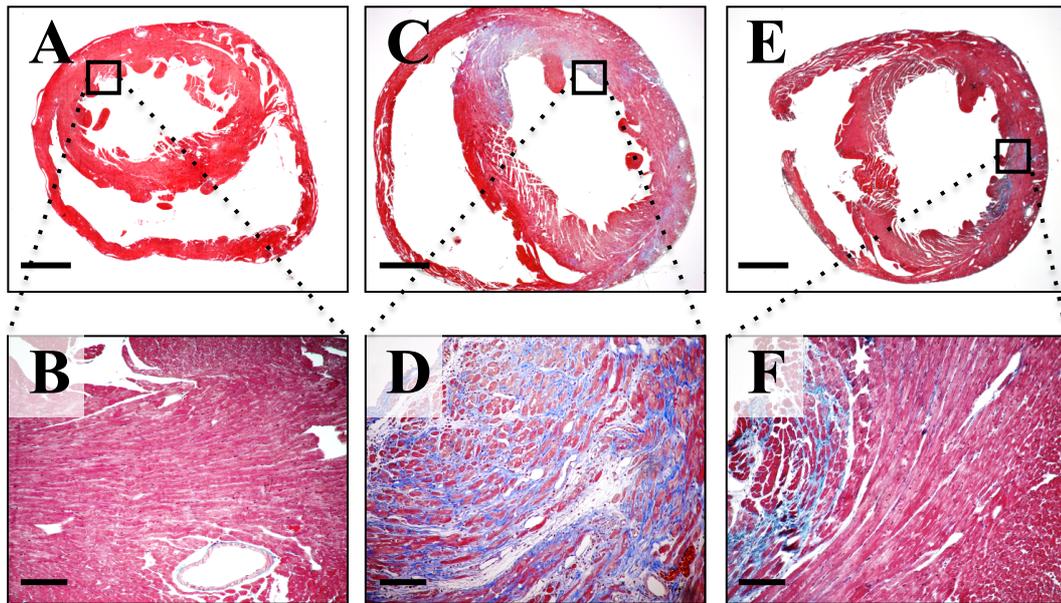


Abbildung 24: Die Blockade von MK schützt die Mäuse vor kardialer Fibrose

Die Abbildung zeigt repräsentative Masson-Trichrom-gefärbte Querschnitte von Mauseherzen an Tag 63 nach Induzieren der Myokarditis. Es sind sowohl Übersichten als Vergrößerung der Präparate (A, B) *Sham*-immunisierter Tiere, (C, D) immunisierter/Isotyp IgG1 behandelte Tiere und (E, F) immunisierter/anti-MK behandelte Tiere zu sehen. $n = 10$ für *Sham*-Kontrollen, $n = 25$ für immunisierte/Isotyp IgG1 behandelte Tiere und immunisierte/anti-MK behandelte Tiere. Referenzbalken entsprechen 1 mm bei Übersichtsaufnahmen und 100 μm bei Vergrößerungen.

3.2.1. Bestimmung der myokardialen Fibrose

Der im histologischen Präparat bereits optisch entstandene Eindruck, dass die Blockade von MK zu einer Verminderung der Narbenbildung in den entsprechenden Herzen führt, konnte mittels eines semiquantitativen Analyseverfahrens zur Bestimmung des Grades der myokardialen Fibrose bestätigt werden. Die Tiere der immunisierten/anti-MK behandelten Gruppe wiesen im Vergleich zur immunisierten/Isotyp IgG1 behandelten Gruppe einen signifikant geringeren Fibrose-Score auf (Abb. 25: $0,8 \pm 0,2$ vs. $1,7 \pm 0,3$; $p < 0,05$). Weiterhin ist erwähnenswert, dass zwischen den *Sham*-immunisierten Kontrolltieren und den immunisierten/anti-MK behandelten Tieren kein statistische signifikanter Unterschied zu beobachten war (Abb. 25: $0,02 \pm 0,01$ vs. $0,8 \pm 0,2$; $p = 0,250$).

V. DISKUSSION

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die biologische Blockade von MK durch einen spezifischen anti-MK-Antikörper zu einer verringerten Einwanderung von Leukozyten und deren verschiedenen Subpopulationen in das Herzmuskelgewebe führt. Dadurch konnten im weiteren Verlauf der EAM die kardiale Funktion geschützt und pathologische Umbauprozesse im Herzen reduziert werden.

Zunächst wurden hierfür H&E-gefärbte Querschnitte der Mäuseherzen histologisch untersucht und mittels semiquantitativer Analyse der Grad der Leukozyteninfiltration (*EAM-Score*) an Tag 21 untersucht. Dieser Zeitpunkt stellt im Versuchsmodell der EAM den Höhepunkt der Entzündung dar und ist charakterisiert u.a. durch zelluläres Infiltrat verschiedener Subpopulationen von Leukozyten (AFANASYEVA et al., 2001a; KANIA et al., 2009). In der vorliegenden Arbeit stellte sich heraus, dass die Blockade von MK die kardiale Inflammation im Vergleich zu Kontrolltieren deutlich reduzieren konnte. Auch die Tatsache, dass ebenso das Verhältnis von Herz-/Körpergewicht durch die MK-Blockade signifikant reduziert wurde, deutet darauf hin, dass bei diesen Tieren eine weniger stark ausgeprägte Entzündungsreaktion innerhalb des Myokards stattgefunden hat. Der Effekt eines angestiegenen Verhältnisses von Herz-/Körpergewicht bei immunisierten/unbehandelten Mäusen im Vergleich zu *Sham*-immunisierten Tieren wurde bereits zuvor beschrieben und lässt sich laut der Autoren vermutlich auf eine kompensatorische Hypertrophie der entzündeten Herzen zurückführen (STULL et al., 2000). Es konnte gezeigt werden, dass die Behandlung der Tiere mit anti-MK dabei helfen konnte, diese kompensatorische Hypertrophie zu minimieren.

Um jedoch nicht nur die absolute Menge an Infiltrat beurteilen zu können, sondern auch die darin enthaltene zelluläre Zusammensetzung genauer zu analysieren, wurden im nächsten Schritt mittels Durchflusszytometrie unterschiedliche Subpopulationen von Leukozyten im beobachteten Infiltrat definiert. Es zeigte sich eine signifikante Reduktion der CD45+ Zellen bei immunisierten/anti-MK behandelten Mäusen im Vergleich zu immunisierten/Isotyp IgG1 behandelten Kontrolltieren. Die Reduktion der

Subpopulation von CD45+/CD11b+/Gr-1+ Zellen in den Herzen von immunisierten/anti-MK behandelten Tieren deutet darauf hin, dass PMN bei den entzündlichen Prozessen und der Infiltration des Myokards während der akuten Phase der Erkrankung eine tragende Rolle zukommen könnte. Die Vermutung, dass MK hierbei einen direkten Einfluss auf die Rekrutierung von PMN hat, wird durch die Beobachtungen von *Weckbach et al.* unterstützt. In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass die Leukozytenadhäsion in postkapillären Venolen des *M. cremaster* in *Mdk*^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu Wildtyptieren deutlich reduziert war. Interessanterweise konnte dieser Effekt durch die Administration von rekombinantem MK aufgehoben werden (WECKBACH et al., 2014). Erwähnenswert ist hierbei, dass nur an Endothel gebundenes MK in der Lage ist eine Rekrutierung von PMN zu initialisieren. So fördert immobilisiertes MK die Adhäsion und die darauffolgende Transmigration von PMN am Endothel während entzündlicher Prozesse, indem es β_2 -Integrine in ein hochaffines Stadium versetzen kann und so über den MK-Rezeptor LRP-1 auf PMN eine Bindung an das Endothel fördert (Abb. 26) (WECKBACH et al., 2014).

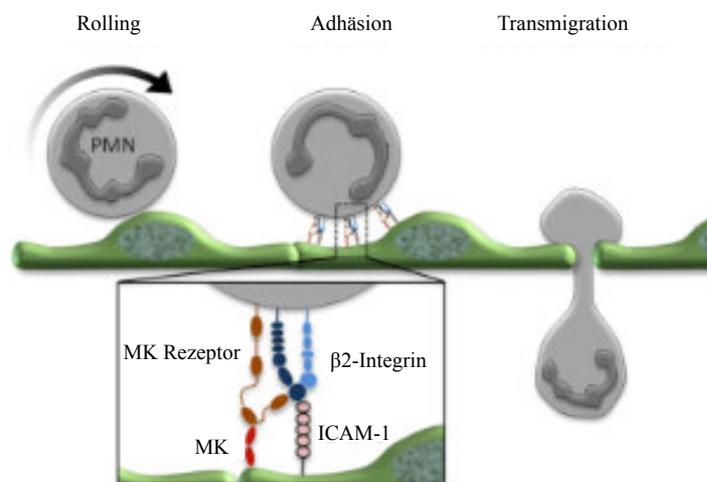


Abbildung 26: Schema der möglichen Rolle von MK während der Rekrutierung von PMN modifiziert nach (HERTER und MAYADAS, 2014)

Immobilisiertes MK versetzt β_2 -Integrine in ein hochaffines Stadium und begünstigt so über einen MK-Rezeptor des neutrophilen Granulozyten dessen Adhäsion und Transmigration am Endothel.

Dieser funktionelle Mechanismus konnte bisher nicht für Monozyten oder T-Zellen gezeigt werden.

In der vorliegenden Arbeit sollte weiterhin eine spezifischere Rolle von PMN

während der Myokarditis, nämlich deren Fähigkeit NETs zu bilden, untersucht werden. Da in der FACS-Analyse deutlich wurde, dass das Infiltrat, u.a. bestehend aus PMN, in den Herzen durch die Blockade von MK signifikant reduziert war, war auch zu erwarten, dass die histologische Analyse mittels IHC-Färbung dieser Zellpopulation ähnliche Ergebnisse zeigen würde. Da die Darstellung der NET-Formation *in vivo* im Herzen jedoch schwer umzusetzen ist, sollte MK als Stimulus für diese spezielle Form des Zelltodes *in vitro* untersucht werden. Hierfür wurde einem Versuch mit humanen PMN und MK beschichteten *Ibidi 8 well slides* durchgeführt. Während bei Negativkontrollen weder Dekondensation der Zellkerne noch NE gezeigt werden konnte, wiesen die auf MK stimulierten PMN deutliche NET-Formation auf. Auch bei der Positivkontrolle durch Stimulation mit IL-8 konnten NETs identifiziert werden. Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass eine der Hauptfunktionen der NET-Formation die Immobilisierung und Abtötung von Pathogenen wie Bakterien oder Viren darstellt (BRINKMANN et al., 2004), scheint es gerade bei Pathologien mit autoimmunem Charakter ohne nachweisbaren Erreger sinnvoll, die Formation von NETs zu unterbinden (KNIGHT et al., 2013). Dies wird weiterhin durch mehrere Studien verdeutlicht, aus denen hervorgeht, dass das Auftreten von NETs nicht nur funktionell der Erregereliminierung dient, sondern auch in Verbindung mit pathologischen Prozessen gebracht wird (ROGHANIAN und SALLENAVE, 2008; DELBOSC et al., 2011). Da die Rolle von NETs während der Pathogenese der Myokarditis bisher nicht ausreichend beschrieben wurde, stellen die Beobachtungen der vorliegenden Arbeit möglicherweise einen Anstoß zu weiteren Untersuchungen dieses Mechanismus dar. Die Ergebnisse der *in vitro*-Versuche zur NET-Formation in dieser Arbeit unterstreichen die Aussage von *Weckbach et al.*, wonach nur immobilisiertes MK und nicht lösliches MK während der Rekrutierung von PMN eine Rolle spielt (WECKBACH et al., 2014). Durch diese Beobachtungen wäre es weiterhin interessant im Mausmodell der EAM zu untersuchen, ob eine MK-Blockade durch anti-MK nicht nur zu einer reduzierten Infiltration durch PMN führen kann, sondern ob PMN durch MK-Blockade in ihrer Fähigkeit der NET-Formation eingeschränkt sind.

Weiterhin offenbarte die FACS-Analyse der Herzen in dieser Arbeit, dass die Subpopulation aus CD45⁺/CD11b⁺/Gr-1⁻ Zellen, die hauptsächlich aus Monozyten und Makrophagen besteht, nach Behandlung der Tiere mit anti-MK

zwar einen Trend zur Reduktion aufwies, welcher statistisch jedoch nicht signifikant war. Eine signifikante Reduktion von CD4⁺-Zellen nach anti-MK Behandlung lässt außerdem auf eine Rolle von MK bei der Rekrutierung von T-Helferzellen schließen. Ein besseres Verständnis des Mechanismus hierzu könnte beispielsweise durch einen Adhäsionsversuch mit T-Zellen auf Endothel unter Blockade von MK oder mittels eines T-Zell-Proliferationsversuchs aus der Milz von anti-MK behandelten und Isotyp IgG1 behandelten Versuchstieren erlangt werden. Bei einem Adhäsionsversuch wäre interessant zu wissen, ob die Adhäsion ähnlich wie auch bei PMN über den MK-bedingten hochaffinen Status von Integrinen und die darauffolgende Bildung der Zellen an Zelladhäsionsmoleküle (CAM) auf dem Endothel reguliert werden kann (WECKBACH et al., 2014). Die Beobachtung, dass eine Blockade von MK zu signifikant weniger T-Zellen in den entsprechenden Herzen der Mäuse führt, legt nahe, dass der T-Zellaktivierung beim Verlauf der Erkrankung eine Schlüsselrolle zukommen könnte und stützt die These, dass die Autoimmunmyokarditis eine hauptsächlich T-Zell-vermittelte Pathologie darstellt (SMITH und ALLEN, 1991). *Wang et al.* konnten in einer anschaulichen Arbeit im Versuchsmodell der Experimentellen Autoimmunenzephalomyelitis (EAE) zeigen, dass *Mdk*^{-/-}-Mäuse deutlich weniger entzündliches Zellinfiltrat im Vergleich zu WT-Tieren in Gehirn und Rückenmark aufwiesen (WANG et al., 2008). *Mdk*^{-/-}-Mäuse zeigten hier außerdem eine signifikant größere Population von CD4⁺/CD25⁺/FoxP3⁺ Zellen, woraus die Forscher schließen, dass die erhöhte Menge T-regulatorischer Zellen (Treg) einen der Hauptmechanismen für den kaum ausgeprägten Phänotyp bei *Mdk*^{-/-}-Mäusen darstellen könnte. Außerdem konnten *Wang et al.* beobachten, dass durch die Abwesenheit von MK ein deutlich geringerer Anteil an autoreaktiven TH1- und TH17-Helferzellen in der Milz zu messen ist (WANG et al., 2008). Diese Zellpopulation ist wie bei der EAE auch bei der EAM für den Progress des Phänotyps verantwortlich (VALAPERTI et al., 2008; BALDEVIANO et al., 2010). Obwohl zusätzlich von *Lee et al.* dargestellt werden konnte, dass der Treg-Population auch im Modell der EAM eine Beteiligung beim Verlauf der Erkrankung zukommt (LEE et al., 2014), konnten diese Effekte durch die vorliegende Arbeit nicht weiter bestätigt werden. Zwar wurde bei der Population CD4⁺/FoxP3⁺ Zellen aus der Milz gezeigt, dass diese sich durch Blockade von MK signifikant vergrößert, jedoch ist dieser Effekt so gering, dass er den ausgeprägten Phänotyp der Erkrankung vermutlich nicht erklären kann.

In dieser Arbeit konnte veranschaulicht werden, dass die Blockade von MK zu einer Abschwächung der akut entzündlichen Prozesse an Tag 21 der EAM führte. Wie sich dieser Effekt nun im weiteren Verlauf des Versuchsmodells auf die kardiale Funktion und die pathologische Umstrukturierung der Herzen auswirkt, wurde an Tag 63 nach Immunisierung der Tiere beurteilt. Zunächst konnte durch Analyse der kardialen Funktion mittels der Parameter FS, LVEF und SVI zu diesem Zeitpunkt eine deutliche Einschränkung bei immunisierten/Isotyp IgG1-behandelten Mäusen beobachtet werden. Durch die Blockade von MK konnte bei den entsprechenden Tieren jedoch eine signifikante Verbesserung der genannten Parameter erzielt werden. Zwar entsprachen die Werte der immunisierten/anti-MK-behandelten Gruppe nicht den bei gesunden Tieren zu erwartenden Normwerten (GAO et al., 2011), dennoch konnte die kardiale Dysfunktion durch Behandlung mit anti-MK im Vergleich zu Kontrolltieren signifikant reduziert werden. Die Vermutung, dass die beobachtete Beeinträchtigung der gemessenen Parameter in direktem Zusammenhang mit dem Grad der myokardialen Fibrose steht, konnte daraufhin mittels semiquantitativer Analyse der histologischen Präparate gestützt werden. So wurde bei von Tag 0 bis Tag 21 mit anti-MK behandelten Tieren signifikant weniger myokardiale Fibrose gemessen als bei immunisierten/Isotyp IgG1-behandelten Kontrolltieren.

Es liegt nahe, dass der verringerte Grad an Fibrose und die weniger stark ausgeprägte kardiale Dysfunktion bei anti-MK-behandelten Tieren nicht direkt auf die Blockade von MK zurückzuführen ist, sondern eher als Folge der deutlich reduzierten Entzündungsreaktion an Tag 21 zu werten ist. Ein ähnlicher Effekt konnte von *Leuschner et al.* beobachtet werden, wonach eine reduzierte Infiltration und Rekrutierung von Monozyten durch die Inaktivierung des Chemokin-Rezeptors 2 mit *small interfering RNA* zu einer positiven Beeinflussung der kardialen Funktion und weniger ausgeprägten pathologischen Umstrukturierung der Herzen im chronischen Verlauf der Erkrankung führte (LEUSCHNER et al., 2015).

Obwohl die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse der Splenozyten an Tag 21 in dieser Arbeit nicht dafür sprechen, kann als mechanistische Erklärung des Phänotyps jedoch auch beim Modell der EAM ein direkter Einfluss der anti-MK-Behandlung auf die T-Zell-gesteuerte Immunantwort wie bei der EAE (WANG et al., 2008) nicht ausgeschlossen werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit geben Grund zur Annahme, dass die Blockade von MK die Leukozyteninfiltration während der akuten Phase der EAM erheblich beeinträchtigt und dadurch im chronischen Stadium deren Folgeschäden wie kardiale Dysfunktion und myokardiale Fibrose im chronischen Stadium deutlich abschwächt. Was MK als therapeutisches Ziel weiterhin durchaus interessant machen könnte, ist die Tatsache, dass dieser Wachstumsfaktor in physiologischem Gewebe eines adulten Organismus kaum exprimiert wird (TSUTSUI et al., 1991). Da eine Behandlung mit AK gegen MK folglich keine Wirkung in gutartigem Gewebe hätte, könnte die Blockade dieses Heparin-bindenden Wachstumsfaktors daher möglicherweise nur wenige Nebenwirkungen zur Folge haben.

Für ein verbessertes Verständnis der Rolle von MK während der Pathogenese der Myokarditis wäre es sinnvoll, in einem neuen Versuchsansatz die Auswirkungen einer Blockade des Wachstumsfaktors zu einem fortgeschrittenen Zeitpunkt der Erkrankung zu untersuchen. Mit der Behandlung der Versuchstiere ab Tag 0 wurde nur in eingeschränkter Weise eine Therapiemöglichkeit simuliert, da eine prophylaktische Blockade von MK in der Klinik sowohl beim Menschen als auch beim Tier nicht realistisch ist. Daher könnte der Therapiestart in einem Folgeversuch im EAM-Modell beispielsweise an Tag 14 definiert werden, da sich zu diesem Zeitpunkt bereits ein entzündliches Infiltrat in den Herzen zu etablieren beginnt. Interessant wäre, hierbei zu untersuchen, inwiefern die Blockade von MK auch zu dieser späteren/akuten Phase der Myokarditis zu einer Verbesserung der kardialen Funktion und pathologischen Umstrukturierung der Herzen führen kann.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Die in dieser Arbeit beschriebenen Versuche wurden mit dem Ziel durchgeführt, ein besseres Verständnis für die Pathologie der Myokarditis zu entwickeln und daraus gegebenenfalls Ansätze für neue Therapieoptionen abzuleiten. Da eine Rolle von MK bereits bei verschiedenen chronisch entzündlichen Erkrankungen beschrieben werden konnte, und im Speziellen die Autoimmunmyokarditis die Folge eines chronisch entzündlichen Prozesses darstellt, liegt es nahe, die Bedeutung des Wachstumsfaktors MK während der Entwicklung dieses Krankheitsbildes genauer zu untersuchen.

Durch die Blockade von MK mit Hilfe spezifischer anti-MK-AK im Mausmodell der EAM konnte gezeigt werden, dass MK bei der Rekrutierung von inflammatorischen Zellen, insbesondere PMN, während der akuten Phase der Myokarditis von essentieller Bedeutung sein könnte. Der verminderte Grad an Infiltration durch verschiedene Subpopulationen inflammatorischer Zellen im Herzmuskelgewebe lässt erkennen, dass die Inhibition von MK in einem signifikant schwächer ausgeprägten Phänotyp der Erkrankung an Tag 21 des Modells resultiert.

Da akute Myokarditiden jedoch sowohl in der Humanmedizin als auch in der Tiermedizin oft unerkannt bleiben und Patienten erst bei anhaltenden Beschwerden vorstellig werden, sollte in dieser Arbeit auch Bezug auf mögliche Spätfolgen einer nicht vollständig ausgeheilten akuten Herzmuskelentzündung genommen werden. Hierbei konnte erfolgreich gezeigt werden, dass eine Blockade von MK auch charakteristische pathologische Veränderungen wie myokardiale Fibrose und kardiale Pumpfunktion positiv beeinflusste. Zwar wird vermutet, dass die Ergebnisse der Analysen im chronischen Stadium als Folge des abgeschwächten Phänotyps während der akuten Phase der Erkrankung zu interpretieren sind, der Nachweis einer direkten Wirkung der MK-Inhibition auf Pathomechanismen während der chronischen Phase wäre jedoch noch zu führen und kann daher nicht ausgeschlossen werden.

VII. SUMMARY – THE ROLE OF MIDKINE IN THE MOUSE MODEL OF EXPERIMENTAL AUTOIMMUNE MYOCARDITIS

The experiments described in this study were performed with the aim to obtain a better understanding of the pathology of myocarditis and to possibly create a new option of therapy for patients suffering from this disease. The role of MK in multiple other chronic inflammatory diseases was already described in detail, however, not in context with myocarditis. Because especially the autoimmune myocarditis represents the result of a persisting inflammatory process it was interesting to investigate the part of the growth factor MK during the pathological mechanisms of this disease.

By blocking MK with a specific anti-MK antibody in the mouse model of EAM it was shown in this work that MK plays a critical role during recruitment of inflammatory cells like PMN at the acute stage of myocarditis. The alleviated degree of infiltration of different subpopulations of inflammatory cells in the myocardial tissue on day 21 of the EAM model reveals that inhibition of MK results in a significantly less developed phenotype at the acute stage of this disease.

However, because acute myocarditis in both humans and animals often remains undetected, and patients only request for medical advice after persisting disorders this study also refers to the long-term consequences of an incomplete recovery after acute myocarditis.

Here, it was shown successfully that blocking MK not only impairs the phenotype of acute myocarditis but beyond that also leads to a positive outcome regarding fibrotic alteration of myocardial tissue and cardiac function.

Although it is supposed that the results during the chronic stage of the disease may possibly be the effect of a less distinct phenotype on day 21 of the EAM model, nevertheless a direct impact of blocking MK on the pathological mechanisms during the chronic development cannot be excluded.

VIII. LITERATURVERZEICHNIS

Abraham C, Cho HJ. Inflammatory bowel disease. *New England Journal of Medicine* 2009; 361: 2066-78.

Afanasyeva M, Wang Y, Kaya Z, Park S, Zilliox MJ, Schofield BH, Hill SL, Rose NR. Experimental autoimmune myocarditis in A/J mice is an interleukin-4-dependent disease with a Th2 phenotype. *The American journal of pathology* 2001a; 159: 193-203.

Afanasyeva M, Wang Y, Kaya Z, Stafford EA, Dohmen KM, Akha AAS, Rose NR. Interleukin-12 receptor/STAT4 signaling is required for the development of autoimmune myocarditis in mice by an interferon- γ -independent pathway. *Circulation* 2001b; 104: 3145-51.

Afanasyeva M, Georgakopoulos D, Belardi DF, Ramsundar AC, Barin JG, Kass DA, Rose NR. Quantitative analysis of myocardial inflammation by flow cytometry in murine autoimmune myocarditis: correlation with cardiac function. *The American journal of pathology* 2004; 164: 807-15.

Akhter S, Ichihara-Tanaka K, Kojima S, Muramatsu H, Inui T, Kimura T, Kaneda N, Talukder AH, Kadomatsu K, Inagaki F. Clusters of basic amino acids in midkine: roles in neurite-promoting activity and plasminogen activator-enhancing activity. *Journal of biochemistry* 1998; 123: 1127-36.

Andréoletti L, Ventéo L, Douche-Aourik F, Canas F, De La Grandmaison GL, Jacques J, Moret H, Jovenin N, Mosnier J-F, Matta M. Active Coxsackieviral B infection is associated with disruption of dystrophin in endomyocardial tissue of patients who died suddenly of acute myocardial infarction. *Journal of the American College of Cardiology* 2007; 50: 2207-14.

Aretz HT. Diagnosis of myocarditis by endomyocardial biopsy. *The Medical Clinics of North America* 1986; 70: 1215.

Aretz HT, Billingham M, Edwards W, Factor S, Fallon J, Fenoglio J, Olsen E, Schoen F. Myocarditis. *Am J Cardiovasc Pathol* 1987; 1: 3-14.

Asai T, Watanabe K, Ichihara-Tanaka K, Kaneda N, Kojima S, Iguchi A, Inagaki F, Muramatsu T. Identification of heparin-binding sites in midkine and their role in neurite-promotion. *Biochemical and biophysical research communications* 1997; 236: 66-70.

Baldeviano GC, Barin JG, Talor MV, Srinivasan S, Bedja D, Zheng D, Gabrielson K, Iwakura Y, Rose NR, Cihakova D. Interleukin-17A is dispensable for myocarditis but essential for the progression to dilated cardiomyopathy. *Circulation research* 2010; 106: 1646-55.

Bancroft JD, Layton C. The hematoxylin and eosin. *Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques*, Expert Consult: Online and Print, 7: Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques 2013: 173.

Baughman KL. Diagnosis of myocarditis. *Circulation* 2006; 113: 593-5.

Baumgärtner W, Gruber AD (2015) *Spezielle Pathologie für die Tiermedizin*. Georg Thieme Verlag.

Bergelson JM, Cunningham JA, Droguett G, Kurt-Jones EA, Krithivas A, Hong JS, Horwitz MS, Crowell RL, Finberg RW. Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science* 1997; 275: 1320-3.

Borregaard N. Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity* 2010; 33: 657-70.

Bouyain S, Watkins DJ. The protein tyrosine phosphatases PTPRZ and PTPRG bind to distinct members of the contactin family of neural recognition molecules. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2010; 107: 2443-8.

Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 2004; 303: 1532-5.

Brinkmann V, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps: Is immunity the second function of chromatin? *The Journal of cell biology* 2012; 198: 773-83.

Caforio A, Grazzini M, Mann JM, Keeling PJ, Bottazzo GF, McKenna WJ, Schiaffino S. Identification of alpha- and beta-cardiac myosin heavy chain isoforms as major autoantigens in dilated cardiomyopathy. *Circulation* 1992; 85: 1734-42.

Caforio AL, Calabrese F, Angelini A, Tona F, Vinci A, Bottaro S, Ramondo A, Carturan E, Iliceto S, Thiene G. A prospective study of biopsy-proven myocarditis: prognostic relevance of clinical and aetiopathogenetic features at diagnosis. *European heart journal* 2007; 28: 1326-33.

Caforio AL, Vinci A, Iliceto S. Anti-heart autoantibodies in familial dilated cardiomyopathy. *Autoimmunity* 2008; 41: 462-9.

Caudrillier A, Kessenbrock K, Gilliss BM, Nguyen JX, Marques MB, Monestier M, Toy P, Werb Z, Looney MR. Platelets induce neutrophil extracellular traps in transfusion-related acute lung injury. *The Journal of clinical investigation* 2012; 122: 2661-71.

Choudhuri R, Zhang H-T, Donnini S, Ziche M, Bicknell R. An angiogenic role for the neurokines midkine and pleiotrophin in tumorigenesis. *Cancer research* 1997; 57: 1814-9.

Chung S-K, Kim J-Y, Kim I-B, Park S-I, Paek K-H, Nam J-H. Internalization and trafficking mechanisms of coxsackievirus B3 in HeLa cells. *Virology* 2005; 333: 31-40.

Cihakova D, Rose NR. Pathogenesis of myocarditis and dilated cardiomyopathy. *Advances in immunology* 2008; 99: 95-114.

Clark SR, Ma AC, Tavener SA, McDonald B, Goodarzi Z, Kelly MM, Patel KD, Chakrabarti S, McAvoy E, Sinclair GD. Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nature medicine* 2007; 13: 463-9.

Cutting GR. Cystic fibrosis genetics: from molecular understanding to clinical application. *Nature Reviews Genetics* 2015; 16: 45-56.

d'Ambrosio A, Patti G, Manzoli A, Sinagra G, Di Lenarda A, Silvestri F, Di Sciascio G. The fate of acute myocarditis between spontaneous improvement and evolution to dilated cardiomyopathy: a review. *Heart* 2001; 85: 499-504.

Davis PB. Cystic fibrosis since 1938. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2006; 173: 475-82.

Dec Jr GW, Palacios IF, Fallon JT, Aretz HT, Mills J, Lee DC, Johnson RA. Active myocarditis in the spectrum of acute dilated cardiomyopathies: clinical features, histologic correlates, and clinical outcome. *New England Journal of Medicine* 1985; 312: 885-90.

Delbosc S, Alsac J-M, Journe C, Louedec L, Castier Y, Bonnaure-Mallet M, Ruimy R, Rossignol P, Bouchard P, Michel J-B. *Porphyromonas gingivalis* participates in pathogenesis of human abdominal aortic aneurysm by neutrophil activation. Proof of concept in rats. *PloS ONE* 2011; 6: e18679.

Eriksson S, Hellman J, Pettersson K. Autoantibodies against cardiac troponins. *New England Journal of Medicine* 2005; 352: 98-100.

Eriksson U, Kurrer MO, Sonderegger I, Iezzi G, Tafuri A, Hunziker L, Suzuki S, Bachmaier K, Bingisser RM, Penninger JM. Activation of dendritic cells through

the interleukin 1 receptor 1 is critical for the induction of autoimmune myocarditis. *The Journal of experimental medicine* 2003a; 197: 323-31.

Eriksson U, Kurrer MO, Schmitz N, Marsch SC, Fontana A, Eugster H-P, Kopf M. Interleukin-6–Deficient Mice Resist Development of Autoimmune Myocarditis Associated With Impaired Upregulation of Complement C3. *Circulation* 2003b; 107: 320-5.

Eriksson U, Ricci R, Hunziker L, Kurrer MO, Oudit GY, Watts TH, Sonderegger I, Bachmaier K, Kopf M, Penninger JM. Dendritic cell–induced autoimmune heart failure requires cooperation between adaptive and innate immunity. *Nature medicine* 2003c; 9: 1484-90.

Escher F, Kühl U, Lassner D, Poller W, Westermann D, Pieske B, Tschöpe C, Schultheiss H-P. Long-term outcome of patients with virus-negative chronic myocarditis or inflammatory cardiomyopathy after immunosuppressive therapy. *Clinical Research in Cardiology* 2016; 105: 1011-20.

Fabri L, Maruta H, Muramatsu H, Muramatsu T, Simpson RJ, Burgess AW, Nice EC. Structural characterisation of native and recombinant forms of the neurotrophic cytokine MK. *Journal of Chromatography A* 1993; 646: 213-25.

Fairweather D, Kaya Z, Shellam GR, Lawson CM, Rose NR. From infection to autoimmunity. *Journal of autoimmunity* 2001; 16: 175-86.

Fairweather D, Rose NR. Coxsackievirus-induced myocarditis in mice: a model of autoimmune disease for studying immunotoxicity. *Methods* 2007; 41: 118-22.

Fairweather D, Cooper LT, Blauwet LA. Sex and gender differences in myocarditis and dilated cardiomyopathy. *Current problems in cardiology* 2013; 38: 7-46.

Feldman AM, McNamara D. Myocarditis. *New England Journal of Medicine*

2000; 343: 1388-98.

Feldmann M, Brennan FM, Maini RN. Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Annual review of immunology* 1996; 14: 397-440.

Flachenecker P, Khil L, Bergmann S, Kowalewski M, Pascu I, Pérez-Miralles F, Sastre-Garriga J, Zvingers T. Development and pilot phase of a European MS register. *Journal of neurology* 2010; 257: 1620-7.

Frustaci A, Russo MA, Chimenti C. Randomized study on the efficacy of immunosuppressive therapy in patients with virus-negative inflammatory cardiomyopathy: the TIMIC study. *European heart journal* 2009; 30: 1995-2002.

Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, Hurwitz R, Schulze I, Wahn V, Weinrauch Y, Brinkmann V, Zychlinsky A. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *The Journal of cell biology* 2007; 176: 231-41.

Fuchs TA, Brill A, Duerschmied D, Schatzberg D, Monestier M, Myers DD, Wroblewski SK, Wakefield TW, Hartwig JH, Wagner DD. Extracellular DNA traps promote thrombosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2010; 107: 15880-5.

Gabriel SE, Michaud K. Epidemiological studies in incidence, prevalence, mortality, and comorbidity of the rheumatic diseases. *Arthritis research & therapy* 2009; 11: 1.

Gao S, Ho D, Vatner DE, Vatner SF. Echocardiography in mice. *Current protocols in mouse biology* 2011: 71-83.

Gauntt C, Arizpe H, Higdon A, Wood H, Bowers D, Rozek M, Crawley R. Molecular mimicry, anti-coxsackievirus B3 neutralizing monoclonal antibodies, and myocarditis. *The Journal of Immunology* 1995; 154: 2983-95.

Gupta AK, Joshi MB, Philippova M, Erne P, Hasler P, Hahn S, Resink TJ. Activated endothelial cells induce neutrophil extracellular traps and are susceptible to NETosis mediated cell death. *FEBS letters* 2010; 584: 3193-7.

Hakkim A, Fürnrohr BG, Amann K, Laube B, Abed UA, Brinkmann V, Herrmann M, Voll RE, Zychlinsky A. Impairment of neutrophil extracellular trap degradation is associated with lupus nephritis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2010; 107: 9813-8.

Hausenloy DJ, Bøtker HE, Condorelli G, Ferdinandy P, Garcia-Dorado D, Heusch G, Lecour S, van Laake LW, Madonna R, Ruiz-Meana M. Translating cardioprotection for patient benefit: position paper from the Working Group of Cellular Biology of the Heart of the European Society of Cardiology. *Cardiovascular research* 2013: cvt004.

Hemmer B, Archelos JJ, Hartung H-P. New concepts in the immunopathogenesis of multiple sclerosis. *Nature Reviews Neuroscience* 2002; 3: 291-301.

Herter JM, Mayadas TN. Midkine, a middle manager of $\beta 2$ integrins. *Blood* 2014; 123: 1777-9.

Horiba M, Kadomatsu K, Nakamura E, Muramatsu H, Ikematsu S, Sakuma S, Hayashi K, Yuzawa Y, Matsuo S, Kuzuya M. Neointima formation in a restenosis model is suppressed in midkine-deficient mice. *The Journal of clinical investigation* 2000; 105: 489-95.

Horiba M, Kadomatsu K, Yasui K, Lee J-K, Takenaka H, Sumida A, Kamiya K, Chen S, Sakuma S, Muramatsu T. Midkine plays a protective role against cardiac ischemia/reperfusion injury through a reduction of apoptotic reaction. *Circulation* 2006; 114: 1713-20.

Huang Y, Hoque MO, Wu F, Trink B, Sidransky D, Ratovitski EA. Midkine induces epithelial-mesenchymal transition through Notch2/Jak2-Stat3 signaling in human keratinocytes. *Cell Cycle* 2008; 7: 1613-22.

Huber MA, Kraut N, Beug H. Molecular requirements for epithelial–mesenchymal transition during tumor progression. *Current opinion in cell biology* 2005; 17: 548-58.

Hufnagel G, Pankuweit S, Richter A, Schonian U, Maisch B. The European study of epidemiology and treatment of cardiac inflammatory diseases (ESETCID). *Herz* 2000; 25: 279–85.

Ichihara-Tanaka K, Oohira A, Rumsby M, Muramatsu T. Neuroglycan C is a novel midkine receptor involved in process elongation of oligodendroglial precursor-like cells. *Journal of Biological Chemistry* 2006; 281: 30857-64.

Ishiguro H, Horiba M, Takenaka H, Sumida A, Opthof T, Ishiguro YS, Kadomatsu K, Murohara T, Kodama I. A single intracoronary injection of midkine reduces ischemia/reperfusion injury in swine hearts: a novel therapeutic approach for acute coronary syndrome. *Frontiers in physiology* 2011; 2: 27.

Iwasaki W, Nagata K, Hatanaka H, Inui T, Kimura T, Muramatsu T, Yoshida K, Tasumi M, Inagaki F. Solution structure of midkine, a new heparin-binding growth factor. *The EMBO journal* 1997; 16: 6936-46.

Kadomatsu K, Tomomura M, Muramatsu T. cDNA cloning and sequencing of a new gene intensely expressed in early differentiation stages of embryonal carcinoma cells and in mid-gestation period of mouse embryogenesis. *Biochemical and biophysical research communications* 1988; 151: 1312-8.

Kadomatsu K, Bencsik P, Görbe A, Csonka C, Sakamoto K, Kishida S, Ferdinandy P. Therapeutic potential of midkine in cardiovascular disease. *British Journal of Pharmacology* 2014; 171: 936-44.

Kaname T, Kuwano A, Murano I, Uehara K, Muramatsu T, Kajii T. Midkine gene (MDK), a gene for prenatal differentiation and neuroregulation, maps to band 11p11.2 by fluorescence in situ hybridization. *Genomics* 1993; 17: 514-5.

Kania G, Blyszczuk P, Stein S, Valaperti A, Germano D, Dirnhofer S, Hunziker L, Matter CM, Eriksson U. Heart-Infiltrating Prominin-1+/CD133+ Progenitor cells represent the cellular source of transforming growth factor β -mediated cardiac fibrosis in experimental autoimmune myocarditis. *Circulation research* 2009; 105: 462-70.

Kaplan MJ, Radic M. Neutrophil extracellular traps: double-edged swords of innate immunity. *The Journal of Immunology* 2012; 189: 2689-95.

Kawai C. From myocarditis to cardiomyopathy: mechanisms of inflammation and cell death. *Circulation* 1999a; 99: 1091-100.

Kawai C. From myocarditis to cardiomyopathy: mechanisms of inflammation and cell death learning from the past for the future. *Circulation* 1999b; 99: 1091-100.

Kaya Z, Afanasyeva M, Wang Y, Dohmen KM, Schlichting J, Tretter T, Fairweather D, Holers VM, Rose NR. Contribution of the innate immune system to autoimmune myocarditis: a role for complement. *Nature immunology* 2001; 2: 739-45.

Kindermann I, Kindermann M, Kandolf R, Klingel K, Bültmann B, Müller T, Lindinger A, Böhm M. Predictors of outcome in patients with suspected myocarditis. *Circulation* 2008; 118: 639-48.

Kindermann I, Barth C, Mahfoud F, Ukena C, Lenski M, Yilmaz A, Klingel K, Kandolf R, Sechtem U, Cooper LT. Update on myocarditis. *Journal of the American College of Cardiology* 2012; 59: 779-92.

Klingel K, Hohenadl C, Canu A, Albrecht M, Seemann M, Mall G, Kandolf R. Ongoing enterovirus-induced myocarditis is associated with persistent heart muscle infection: quantitative analysis of virus replication, tissue damage, and inflammation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1992; 89: 314-8.

Klingel K, Fabritius C, Sauter M, Göldner K, Stauch D, Kandolf R, Ettischer N, Gahlen S, Schönberger T, Ebner S. The activating receptor NKG2D of natural killer cells promotes resistance against enterovirus mediated inflammatory cardiomyopathy. *The Journal of pathology* 2014; 234: 164-77.

Knight JS, Zhao W, Luo W, Subramanian V, O'Dell AA, Yalavarthi S, Hodgins JB, Eitzman DT, Thompson PR, Kaplan MJ. Peptidylarginine deiminase inhibition is immunomodulatory and vasculoprotective in murine lupus. *The Journal of clinical investigation* 2013; 123: 2981-93.

Kojima S, Inui T, Kimura T, Sakakibara S, Muramatsu H, Amanuma H, Maruta H, Muramatsu T. Synthetic peptides derived from midkine enhance plasminogen activator activity in bovine aortic endothelial cells. *Biochemical and biophysical research communications* 1995; 206: 468-73.

Kosugi T, Yuzawa Y, Sato W, Kawai H, Matsuo S, Takei Y, Muramatsu T, Kadomatsu K. Growth factor midkine is involved in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *The American journal of pathology* 2006; 168: 9-19.

Kosugi T, Yuzawa Y, Sato W, Arata-Kawai H, Suzuki N, Kato N, Matsuo S, Kadomatsu K. Midkine is involved in tubulointerstitial inflammation associated with diabetic nephropathy. *Laboratory investigation* 2007; 87: 903-13.

Krzystek-Korpaczka M, Neubauer K, Matusiewicz M. Clinical relevance of circulating midkine in ulcerative colitis. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 2009; 47: 1085-90.

Krzystek-Korpaczka M, Gorska S, Diakowska D, Kapturkiewicz B, Podkowik M, Gamian A, Bednarczyk Misa I. Midkine is up-regulated in both cancerous and inflamed bowel, reflecting lymph node metastasis in colorectal cancer and clinical activity of ulcerative colitis. *Cytokine* 2016;

Krzystek-Korpaczka M, Neubauer K, Matusiewicz M. Circulating midkine in Crohn's disease: Clinical implications. *Inflammatory bowel diseases* 2010; 16:

208-15.

Kühl U, Pauschinger M, Seeberg B, Lassner D, Noutsias M, Poller W, Schultheiss H-P. Viral persistence in the myocardium is associated with progressive cardiac dysfunction. *Circulation* 2005a; 112: 1965-70.

Kühl U, Pauschinger M, Noutsias M, Seeberg B, Bock T, Lassner D, Poller W, Kandolf R, Schultheiss H-P. High prevalence of viral genomes and multiple viral infections in the myocardium of adults with “idiopathic” left ventricular dysfunction. *Circulation* 2005b; 111: 887-93.

Kytö V, Sipilä J, Rautava P. The effects of gender and age on occurrence of clinically suspected myocarditis in adulthood. *Heart* 2013; 99: 1681-4.

Lane J, Neumann DA, Lafond-Walker A, Herskowitz A, Rose NR. Interleukin 1 or tumor necrosis factor can promote Coxsackie B3-induced myocarditis in resistant B10. A mice. *The Journal of experimental medicine* 1992; 175: 1123-9.

Lee J-H, Kim T-H, Park HE, Lee EG, Jung N-C, Song J-Y, Seo HG, Seung K-B, Chang K, Lim D-S. Myosin-primed tolerogenic dendritic cells ameliorate experimental autoimmune myocarditis. *Cardiovascular research* 2014; 101: 203-10.

Lee SH, Suh HN, Lee YJ, Seo BN, Ha JW, Han HJ. Midkine prevented hypoxic injury of mouse embryonic stem cells through activation of Akt and HIF-1 α via low-density lipoprotein receptor-related protein-1. *Journal of cellular physiology* 2012; 227: 1731-9.

Leffler J, Martin M, Gullstrand B, Tydén H, Lood C, Truedsson L, Bengtsson AA, Blom AM. Neutrophil extracellular traps that are not degraded in systemic lupus erythematosus activate complement exacerbating the disease. *The Journal of Immunology* 2012; 188: 3522-31.

Leuschner F, Li J, Göser S, Reinhardt L, Öttl R, Bride P, Zehelein J, Pfitzer G, Remppis A, Giannitsis E. Absence of auto-antibodies against cardiac troponin I predicts improvement of left ventricular function after acute myocardial infarction. *European heart journal* 2008; 29: 1949-55.

Leuschner F, Courties G, Dutta P, Mortensen LJ, Gorbatov R, Sena B, Novobrantseva TI, Borodovsky A, Fitzgerald K, Koteliansky V. Silencing of CCR2 in myocarditis. *European heart journal* 2015; 36: 1478-88.

Li P, Li M, Lindberg MR, Kennett MJ, Xiong N, Wang Y. PAD4 is essential for antibacterial innate immunity mediated by neutrophil extracellular traps. *The Journal of experimental medicine* 2010; 207: 1853-62.

Li Y, Heuser JS, Cunningham LC, Kosanke SD, Cunningham MW. Mimicry and antibody-mediated cell signaling in autoimmune myocarditis. *The Journal of Immunology* 2006; 177: 8234-40.

Li Y-S, Milner PG, Chauhan AK, Watson MA, Hoffman RM. Cloning and expression of a developmentally regulated protein that induces mitogenic and neurite outgrowth activity. *Science* 1990; 250: 1690.

Liao L, Sindhvani R, Rojkind M, Factor S, Leinwand L, Diamond B. Antibody-mediated autoimmune myocarditis depends on genetically determined target organ sensitivity. *The Journal of experimental medicine* 1995; 181: 1123-31.

Liu PP, Mason JW. Advances in the understanding of myocarditis. *Circulation* 2001; 104: 1076-82.

Liu X, Yao D-L, Bondy CA, Brenner M, Hudson LD, Zhou J. Astrocytes express insulin-like growth factor-I (IGF-I) and its binding protein, IGFBP-2, during demyelination induced by experimental autoimmune encephalomyelitis. *Molecular and Cellular Neuroscience* 1994; 5: 418-30.

Liu X, Mashour GA, Webster HD, Kurtz A. Basic FGF and FGF receptor 1 are expressed in microglia during experimental autoimmune encephalomyelitis: Temporally distinct expression of midkine and pleiotrophin. *Glia* 1998; 24: 390-7.

Maeda N, Noda M. Involvement of receptor-like protein tyrosine phosphatase ζ /RPTP β and its ligand pleiotrophin/heparin-binding growth-associated molecule (HB-GAM) in neuronal migration. *The Journal of cell biology* 1998; 142: 203-16.

Maeda N, Ichihara-Tanaka K, Kimura T, Kadomatsu K, Muramatsu T, Noda M. A Receptor-like Protein-tyrosine Phosphatase PTP ζ /RPTP β Binds a Heparin-binding Growth Factor Midkine INVOLVEMENT OF ARGININE 78 OF MIDKINE IN THE HIGH AFFINITY BINDING TO PTP ζ . *Journal of Biological Chemistry* 1999; 274: 12474-9.

Maeda S, Shinchi H, Kurahara H, Mataka Y, Noma H, Maemura K, Aridome K, Yokomine T, Natsugoe S, Aikou T. Clinical significance of midkine expression in pancreatic head carcinoma. *British journal of cancer* 2007; 97: 405-11.

Mahrholdt H, Wagner A, Deluigi CC, Kispert E, Hager S, Meinhardt G, Vogelsberg H, Fritz P, Dippon J, Bock C-T. Presentation, patterns of myocardial damage, and clinical course of viral myocarditis. *Circulation* 2006; 114: 1581-90.

Manzenreiter R, Kienberger F, Marcos V, Schilcher K, Krautgartner WD, Obermayer A, Huml M, Stoiber W, Hector A, Griese M. Ultrastructural characterization of cystic fibrosis sputum using atomic force and scanning electron microscopy. *Journal of Cystic Fibrosis* 2012; 11: 84-92.

Maron BJ, Towbin JA, Thiene G, Antzelevitch C, Corrado D, Arnett D, Moss AJ, Seidman CE, Young JB. 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: 1807-16.

Martinelli S, Urosevic M, Daryadel A, Oberholzer PA, Baumann C, Fey MF, Dummer R, Simon H-U, Yousefi S. Induction of genes mediating interferon-dependent extracellular trap formation during neutrophil differentiation. *Journal of Biological Chemistry* 2004; 279: 44123-32.

Marty RR, Dirnhofer S, Mauermann N, Schweikert S, Akira S, Hunziker L, Penninger JM, Eriksson U. MyD88 signaling controls autoimmune myocarditis induction. *Circulation* 2006; 113: 258-65.

Maruyama K, Muramatsu H, Ishiguro N, Muramatsu T. Midkine, a heparin-binding growth factor, is fundamentally involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism* 2004; 50: 1420-9.

Mason JW TS, Renlund D. Myocarditis. *Cardiovasc Med* 2007; 6: 1313– 47.

Massberg S, Grahl L, von Bruehl M-L, Manukyan D, Pfeiler S, Goosmann C, Brinkmann V, Lorenz M, Bidzhekov K, Khandagale AB. Reciprocal coupling of coagulation and innate immunity via neutrophil serine proteases. *Nature medicine* 2010; 16: 887-96.

Mattar MC, Lough D, Pishvaian MJ, Charabaty A. Current management of inflammatory bowel disease and colorectal cancer. *Gastrointestinal cancer research: GCR* 2011; 4: 53.

Metzler KD, Fuchs TA, Nauseef WM, Reumaux D, Roesler J, Schulze I, Wahn V, Papayannopoulos V, Zychlinsky A. Myeloperoxidase is required for neutrophil extracellular trap formation: implications for innate immunity. *Blood* 2011; 117: 953-9.

Mills KH. Regulatory T cells: friend or foe in immunity to infection? *Nature Reviews Immunology* 2004; 4: 841-55.

Morailon R, Legeay Y, Boussarie D (2009) Therapielexikon der Kleintierpraxis: Hunde, Katzen, Kaninchen, Nager, Frettchen, Reptilien und Vögel. Elsevier, Urban&FischerVerlag

Muramaki M, Miyake H, Hara I, Kamidono S. Introduction of midkine gene into human bladder cancer cells enhances their malignant phenotype but increases their sensitivity to antiangiogenic therapy. *Clinical cancer research* 2003; 9: 5152-60.

Muramatsu H, Zou K, Sakaguchi N, Ikematsu S, Sakuma S, Muramatsu T. LDL receptor-related protein as a component of the midkine receptor. *Biochemical and biophysical research communications* 2000; 270: 936-41.

Muramatsu H, Zou P, Suzuki H. $\alpha 4\beta 1$ - and $\alpha 6\beta 1$ -integrins are functional receptors for midkine, a heparin-binding growth factor. *Journal of Cell Science* 2004; 117: 5405–15.

Muramatsu T. Midkine, a heparin-binding cytokine with multiple roles in development, repair and diseases. *Proceedings of the Japan Academy, Series B* 2010; 86: 410-25.

Muramatsu T. Structure and function of midkine as the basis of its pharmacological effects. *British Journal of Pharmacology* 2014; 171: 814-26.

Nakagawara A, Milbrandt J, Muramatsu T, Deuel TF, Zhao H, Cnaan A, Brodeur GM. Differential expression of pleiotrophin and midkine in advanced neuroblastomas. *Cancer research* 1995; 55: 1792-7.

Nakanishi T, Kadomatsu K, Okamoto T, Ichihara-Tanaka K, Kojima T, Saito H, Tomoda Y, Muramatsu T. Expression of syndecan-1 and-3 during embryogenesis of the central nervous system in relation to binding with midkine. *The Journal of Biochemistry* 1997; 121: 197-205.

Narita H, Chen S, Komori K, Kadomatsu K. Midkine is expressed by infiltrating macrophages in in-stent restenosis in hypercholesterolemic rabbits. *Journal of vascular surgery* 2008; 47: 1322-9.

Neeli I, Khan SN, Radic M. Histone deimination as a response to inflammatory stimuli in neutrophils. *The Journal of Immunology* 2008; 180: 1895-902.

Nelson RW, Couto CG, Holtermann H (2014) *Innere Medizin der Kleintiere*. "Elsevier, Urban & Fischer Verlag"

Neu N, Rose NR, Beisel KW, Herskowitz A, Gurri-Glass G, Craig SW. Cardiac myosin induces myocarditis in genetically predisposed mice. *The Journal of Immunology* 1987a; 139: 3630-6.

Neu N, Beisel KW, Traystman MD, Rose NR, Craig S. Autoantibodies specific for the cardiac myosin isoform are found in mice susceptible to Coxsackievirus B3-induced myocarditis. *The Journal of Immunology* 1987b; 138: 2488-92.

Neumann D, Lane J, Wulff S, Allen G, LaFond-Walker A, Herskowitz A, Rose N. In vivo deposition of myosin-specific autoantibodies in the hearts of mice with experimental autoimmune myocarditis. *The Journal of Immunology* 1992; 148: 3806-13.

Neumann DA, Burek CL, Baughman KL, Rose NR, Herskowitz A. Circulating heart-reactive antibodies in patients with myocarditis or cardiomyopathy. *Journal of the American College of Cardiology* 1990; 16: 839-46.

O'Brien T, Cranston D, Fuggle S, Bicknell R, Harris AL. The angiogenic factor midkine is expressed in bladder cancer, and overexpression correlates with a poor outcome in patients with invasive cancers. *Cancer research* 1996; 56: 2515-8.

Oohira A, Shuo T, Tokita Y, Nakanishi K, Aono S. Neuroglycan C, a brain-specific part-time proteoglycan, with a particular multidomain structure.

Glycoconjugate journal 2004; 21: 53-7.

Pankuweit S, Moll R, Baandrup U, Portig I, Hufnagel G, Maisch B. Prevalence of the parvovirus B19 genome in endomyocardial biopsy specimens. *Human pathology* 2003; 34: 497-503.

Pankuweit S, Lamparter S, Schoppet M, Maisch B. Parvovirus B19 genome in endomyocardial biopsy specimen. *Circulation* 2004; 109: e179-e.

Papayannopoulos V, Staab D, Zychlinsky A. Neutrophil elastase enhances sputum solubilization in cystic fibrosis patients receiving DNase therapy. *PloS ONE* 2011; 6: e28526.

Richardson P, McKenna R, Bristow M, Maisch B, Mautner B, O'Connell J, Olsen E, Thiene G, Goodwin J, Gyarfás I. 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: 841-2.

Ritz E, Orth SR. Nephropathy in patients with type 2 diabetes mellitus. *New England Journal of Medicine* 1999; 341: 1127-33.

Rivers TM, Sprunt D, Berry G. Observations on attempts to produce acute disseminated encephalomyelitis in monkeys. *The Journal of experimental medicine* 1933; 58: 39-53.

Roghanian A, Sallenave J-M. Neutrophil elastase (NE) and NE inhibitors: canonical and noncanonical functions in lung chronic inflammatory diseases (cystic fibrosis and chronic obstructive pulmonary disease). *Journal of aerosol medicine and pulmonary drug delivery* 2008; 21: 125-44.

Roman MJ, Shanker B-A, Davis A, Lockshin MD, Sammaritano L, Simantov R, Crow MK, Schwartz JE, Paget SA, Devereux RB. Prevalence and correlates of accelerated atherosclerosis in systemic lupus erythematosus. *New England*

Journal of Medicine 2003; 349: 2399-406.

Rose NR, Beisel KW, Herskowitz A, Neu N, Wolfgram LJ, Alvarez FL, Traystman MD, Craig SW. Cardiac myosin and autoimmune myocarditis. *Autoimmunity and Autoimmune Disease* 1987; 3-24.

Rose NR, Hill S. Autoimmune myocarditis. *Int J Cardiol* 1996; 54: 171-5.

Ross R. Atherosclerosis—an inflammatory disease. *New England Journal of Medicine* 1999; 340: 115-26.

Ruan M, Ji T, Wu Z, Zhou J, Zhang C. Evaluation of expression of midkine in oral squamous cell carcinoma and its correlation with tumour angiogenesis. *International journal of oral and maxillofacial surgery* 2007; 36: 159-64.

Sack U, Tarnok A, Rothe G (2007) *Zelluläre Diagnostik: Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie*; 163 Tabellen. Karger Medical and Scientific Publishers.

Saffarzadeh M, Juenemann C, Queisser MA, Lochnit G, Barreto G, Galuska SP, Lohmeyer J, Preissner KT. Neutrophil extracellular traps directly induce epithelial and endothelial cell death: a predominant role of histones. *PloS ONE* 2012; 7: e32366.

Sakaguchi N, Muramatsu H, Ichihara-Tanaka K, Maeda N, Noda M, Yamamoto T, Michikawa M, Ikematsu S, Sakuma S, Muramatsu T. Receptor-type protein tyrosine phosphatase ζ as a component of the signaling receptor complex for midkine-dependent survival of embryonic neurons. *Neuroscience research* 2003; 45: 219-24.

Sato W, Kadomatsu K, Yuzawa Y, Muramatsu H, Hotta N, Matsuo S, Muramatsu T. Midkine is involved in neutrophil infiltration into the tubulointerstitium in ischemic renal injury. *The Journal of Immunology* 2001; 167: 3463-9.

Sato W, Takei Y, Yuzawa Y, Matsuo S, Kadomatsu K, Muramatsu T. Midkine antisense oligodeoxyribonucleotide inhibits renal damage induced by ischemic reperfusion. *Kidney international* 2005; 67: 1330-9.

Schultheiss H-P, Kühl U. Myokarditis. *DMW - Deutsche Medizinische Wochenschrift* 2008; 133: S290-S4.

Schultheiss H-P, Kühl U, Cooper LT. The management of myocarditis. *European heart journal* 2011; 32: 2616-25.

Shi Y, Chen C, Lisewski U, Wrackmeyer U, Radke M, Westermann D, Sauter M, Tschöpe C, Poller W, Klingel K. Cardiac deletion of the Coxsackievirus-adenovirus receptor abolishes Coxsackievirus B3 infection and prevents myocarditis in vivo. *Journal of the American College of Cardiology* 2009; 53: 1219-26.

Simon-Chazottes D, Matsubara S, Miyauchi T, Muramatsu T, Guénet JL. Chromosomal localization of two cell surface-associated molecules of potential importance in development: Midkine (Mdk) and basigin (Bsg). *Mammalian Genome* 1992; 2: 269-71.

Smith S, Allen P. Myosin-induced acute myocarditis is a T cell-mediated disease. *The Journal of Immunology* 1991; 147: 2141-7.

Stoica GE, Kuo A, Powers C, Bowden ET, Sale EB, Riegel AT, Wellstein A. Midkine binds to anaplastic lymphoma kinase (ALK) and acts as a growth factor for different cell types. *Journal of Biological Chemistry* 2002; 277: 35990-8.

Stull LB, DiIulio NA, Yu M, McTiernan CF, Ratliff NB, Tuohy VK, Moravec CS. Alterations in cardiac function and gene expression during autoimmune myocarditis in mice. *Journal of molecular and cellular cardiology* 2000; 32: 2035-49.

Taqueti VR, Mitchell RN, Lichtman AH. Protecting the pump: controlling myocardial inflammatory responses. *Annu. Rev. Physiol.* 2006; 68: 67-95.

Terato K, Hasty KA, Reife RA, Cremer MA, Kang A, Stuart J. Induction of arthritis with monoclonal antibodies to collagen. *The Journal of Immunology* 1992; 148: 2103-8.

Timmerman LA, Grego-Bessa J, Raya A, Bertrán E, Pérez-Pomares JM, Díez J, Aranda S, Palomo S, McCormick F, Izpisúa-Belmonte JC. Notch promotes epithelial-mesenchymal transition during cardiac development and oncogenic transformation. *Genes & development* 2004; 18: 99-115.

Tomko RP, Xu R, Philipson L. HCAR and MCAR: the human and mouse cellular receptors for subgroup C adenoviruses and group B coxsackieviruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1997; 94: 3352-6.

Tomomura M, Kadomatsu K, Matsubara S, Muramatsu T. A retinoic acid-responsive gene, MK, found in the teratocarcinoma system. Heterogeneity of the transcript and the nature of the translation product. *Journal of Biological Chemistry* 1990; 265: 10765-70.

Tschöpe C, Bock C-T, Kasner M, Noutsias M, Westermann D, Schwimmbeck P-L, Pauschinger M, Poller W-C, Kühl U, Kandolf R. High prevalence of cardiac parvovirus B19 infection in patients with isolated left ventricular diastolic dysfunction. *Circulation* 2005; 111: 879-86.

Tsutsui J-i, Uehara K, Kadomatsu K, Matsubara S, Muramatsu T. A new family of heparin-binding factors: strong conservation of midkine (MK) sequences between the human and the mouse. *Biochemical and biophysical research communications* 1991; 176: 792-7.

Uehara K, Matsubara S, Kadomatsu K, Tsutsui J-i, Muramatsu T. Genomic Structure of Human Midkine (MK), a Retinoic Acid-Responsive Growth/Differentiation Factor. *Journal of biochemistry* 1992; 111: 563-7.

Ueoka C, Kaneda N, Okazaki I, Nadanaka S, Muramatsu T, Sugahara K. Neuronal Cell Adhesion, Mediated by the Heparin-binding Neuroregulatory Factor Midkine, Is Specifically Inhibited by Chondroitin Sulfate E STRUCTURAL AND FUNCTIONAL IMPLICATIONS OF THE OVER-SULFATED CHONDROITIN SULFATE. *Journal of Biological Chemistry* 2000; 275: 37407-13.

Urowitz MB, Bookman AA, Koehler BE, Gordon DA, Smythe HA, Ogryzlo MA. The bimodal mortality pattern of systemic lupus erythematosus. *The American journal of medicine* 1976; 60: 221-5.

Valaperti A, Marty RR, Kania G, Germano D, Mauermann N, Dirnhofer S, Leimenstoll B, Blyszczuk P, Dong C, Mueller C. CD11b+ monocytes abrogate Th17 CD4+ T cell-mediated experimental autoimmune myocarditis. *The Journal of Immunology* 2008; 180: 2686-95.

Villanueva E, Yalavarthi S, Berthier CC, Hodgins JB, Khandpur R, Lin AM, Rubin CJ, Zhao W, Olsen SH, Klinker M. Netting neutrophils induce endothelial damage, infiltrate tissues, and expose immunostimulatory molecules in systemic lupus erythematosus. *The Journal of Immunology* 2011; 187: 538-52.

Vos T, Barber RM, Bell B, Bertozzi-Villa A, Biryukov S, Bolliger I, Charlson F, Davis A, Degenhardt L, Dicker D. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 301 acute and chronic diseases and injuries in 188 countries, 1990–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *The Lancet* 2015; 386: 743-800.

Vossenaar ER, Zendman AJ, van Venrooij WJ, Pruijn GJ. PAD, a growing family of citrullinating enzymes: genes, features and involvement in disease. *Bioessays* 2003; 25: 1106-18.

Wang J, Takeuchi H, Sonobe Y, Jin S, Mizuno T, Miyakawa S, Fujiwara M, Nakamura Y, Kato T, Muramatsu H. Inhibition of midkine alleviates experimental autoimmune encephalomyelitis through the expansion of regulatory T cell

population. Proceedings of the National Academy of Sciences 2008; 105: 3915-20.

Wang Y, Li M, Stadler S, Correll S, Li P, Wang D, Hayama R, Leonelli L, Han H, Grigoryev SA. Histone hypercitrullination mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation. J Cell Biol 2009; 184: 205-13.

Weckbach LT, Muramatsu T, Walzog B. Midkine in inflammation. The Scientific World Journal 2011; 11: 2491-505.

Weckbach LT. Midkine in Inflammation. TheScientificWorldJournal 2011; 11: 2491-505.

Weckbach LT, Groesser L, Borgolte J, Pagel J-I, Pogoda F, Schymeinsky J, Müller-Höcker J, Shakibaei M, Muramatsu T, Deindl E. Midkine acts as proangiogenic cytokine in hypoxia-induced angiogenesis. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology 2012; 303: H429-H38.

Weckbach LT, Gola A, Winkelmann M, Jakob SM, Groesser L, Borgolte J, Pogoda F, Pick R, Pruenster M, Müller-Höcker J. The cytokine midkine supports neutrophil trafficking during acute inflammation by promoting adhesion via $\beta 2$ integrins (CD11/CD18). Blood 2014; 123: 1887-96.

Wekerle H, Kojima K, Lannes-Vieira J, Lassmann H, Linington C. Animal models. Annals of neurology 1994; 36: S47-S53.

Yilmaz A, Klingel K, Kandolf R, Sechtem U. A geographical mystery: do cardiotropic viruses respect national borders? Journal of the American College of Cardiology 2008; 52: 82.

Yuki T, Ishihara S, Rumi M, Ortega-Cava CF, Kadowaki Y, Kazumori H, Ishimura N, Amano Y, Moriyama N, Kinoshita Y. Increased expression of midkine in the rat colon during healing of experimental colitis. American Journal

of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology 2006; 291: G735-G43.

Zou P, Zou K, Muramatsu H, Ichihara-Tanaka K, Habuchi O, Ohtake S, Ikematsu S, Sakuma S, Muramatsu T. Glycosaminoglycan structures required for strong binding to midkine, a heparin-binding growth factor. *Glycobiology* 2003; 13: 35-42.

IX. ANHANG

1. Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1: Schematische Darstellung des pathologischen Prozesses während der virusbedingten Myokarditis</i>	6
<i>Abbildung 2: Schematische Darstellung der Myokarditis-Induktion.....</i>	43
<i>Abbildung 3: Schematische Darstellung des Studiendesigns.....</i>	44
<i>Abbildung 4: Schematische Darstellung der Beschichtung der Ibidi 8 well slides und Stimulation muriner PMN.....</i>	48
<i>Abbildung 5: Schematische Darstellung der Beschichtung der Ibidi 8 well slides und Stimulation humaner PMN.....</i>	50
<i>Abbildung 6: Repräsentatives Beispiel eines Bildausschnittes zur Messung der myokardialen Fibrose.</i>	52
<i>Abbildung 7: Schematische Darstellung der hydrodynamischen Fokussierung... </i>	53
<i>Abbildung 8: Schematische Darstellung der durchflusszytometrischen Analyse .</i>	54
<i>Abbildung 9: Vevo 2100.....</i>	58
<i>Abbildung 10: anti-MK reduziert MK-Bindung an Endothelzellen</i>	61
<i>Abbildung 11: Die Blockade von MK verringert den Grad der Leukozyteninfiltration</i>	62
<i>Abbildung 12: Die Blockade von MK reduziert den EAM-Score deutlich.....</i>	63
<i>Abbildung 13: Die Blockade von MK normalisiert Herz-/Körpergewicht-Verhältnis</i>	64
<i>Abbildung 14: Gating-Strategie.....</i>	65
<i>Abbildung 15: anti-MK reduziert Leukozyteninfiltration</i>	66
<i>Abbildung 16: anti-MK reduziert Infiltration durch PMN</i>	67
<i>Abbildung 17: anti-MK reduziert Infiltration von Monozyten/Makrophagen nicht signifikant.....</i>	68
<i>Abbildung 18: anti-MK reduziert Infiltration von T-Helferzellen</i>	69
<i>Abbildung 19: Die Blockade von MK hat keinen hinreichenden Einfluss auf die Leukozytenexpansion in der Milz</i>	70
<i>Abbildung 20: MK stimuliert murine PMN und fördert NET-Formation.....</i>	71
<i>Abbildung 21: MK stimuliert PMN und fördert NET-Formation</i>	73
<i>Abbildung 22: anti-MK-Behandlung reduziert kardiale Dysfunktion</i>	74

<i>Abbildung 23: Die Blockade von MK mildert kardiale Dysfunktion</i>	<i>76</i>
<i>Abbildung 24: Die Blockade von MK schützt die Mäuse vor kardialer Fibrose..</i>	<i>77</i>
<i>Abbildung 25: Die Blockade von MK reduziert den Grad der myokardialen Fibrose</i>	<i>78</i>
<i>Abbildung 26: Schema der möglichen Rolle von MK während der Rekrutierung von PMN.....</i>	<i>80</i>

2. Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: Übersicht der möglichen Ursachen für Myokarditis</i>	<i>4</i>
<i>Tabelle 2: Übersicht möglicher Auslöser der Myokarditis beim Tier</i>	<i>10</i>
<i>Tabelle 3: Vergleich der Homologie zwischen Aminosäuresequenzen von humanem und murinem MK.....</i>	<i>22</i>
<i>Tabelle 4: Übersicht der MK-Rezeptoren.....</i>	<i>25</i>
<i>Tabelle 5: MK bei entzündlichen Erkrankungen</i>	<i>33</i>

X. DANKSAGUNG

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

Als Erstes möchte ich mich bei Herrn Prof. Eckhard Wolf für die unkomplizierte Zusammenarbeit und die Vertretung dieser Arbeit vor dem Promotionsausschuss bedanken.

Außerdem möchte ich dem Klinikdirektor Herrn Prof. Dr. Steffen Massberg und dem Arbeitsgruppenleiter Herrn PD Dr. Stefan Brunner für die Möglichkeit danken, diese Arbeit in der Med. I des Klinikums Großhadern anfertigen zu dürfen. In der Arbeitsgruppe konnte ich mich zu jeder Zeit auf tolle Unterstützung und wertvolle Denkanstöße durch die Erfahrung aller Beteiligten verlassen.

Mein besonderer Dank geht hierbei an Herrn Dr. Ulrich Grabmaier, der diese Arbeit durch meine Einstellung und Finanzierung überhaupt ermöglicht hat und mir schier endlose scheinende Stunden am Ultraschallgerät versüßt hat. An gleicher Stelle danke ich ebenso Herrn Dr. Ludwig Weckbach für unsere hervorragende Zusammenarbeit im Labor, seine Geduld und seine großartige Hilfestellung in jeglicher Fragestellung meiner Arbeit.

Weiterhin möchte ich ganz besonders der medizinisch-technischen Assistentin Frau Judith Arcifa danken. Ohne ihre Hilfe und Erfahrung wäre mein Leben als Doktorand sehr viel frustrierender gewesen. Ich danke ihr nicht nur für die tolle fachliche Unterstützung, sondern auch für sehr viel Spaß und gute Laune am Arbeitsplatz.

Neben meinen Kollegen in Großhadern will ich mich auch bei den Mitarbeitern im Institut für Tierpathologie der LMU bedanken. Allen voran bei Herrn Dr. Andreas Parzefall, der immer ein sehr zuverlässiger Ansprechpartner war und mich sehr geduldig und ausführlich in die Methoden der Histologie und Mikroskopie eingewiesen hat. Außerdem bedanke ich mich bei Frau Doris Merl und Frau Michaela Nützel für die tolle Unterstützung bei der Bearbeitung meiner Proben und Einführung in die Arbeit mit dem Mikrotom.

Auch außerhalb der Arbeit kann ich mich nicht genug für die bei weitem nicht selbstverständliche private Unterstützung durch die gesamte Arbeitsgruppe bedanken, die ich während meiner Promotion erfahren habe!

Abschließend möchte ich mich bei meiner Familie dafür bedanken, dass ich mich zu jeder Zeit auf sie verlassen konnte. Ohne die grenzenlose Unterstützung durch meine Mutter in allen Lebenslagen wäre weder das Studium noch die Promotion in dieser Form möglich gewesen. Auch bei meinem Bruder möchte ich mich nicht nur für seine hervorragende Hilfestellung in allen möglichen statistischen Fragestellungen meinerseits bedanken. Die regelmäßige Entspannung und Freude bei gemeinsamen Angelausflügen war für meine Energie bei der Arbeit unerlässlich. Natürlich danke ich auch meinem Großvater Wilhelm Linnerz für die tolle Unterstützung, die ich von ihm während dem Studium und der Promotion erhalten habe.

Das letzte Wort gilt dem wichtigsten Menschen in meinem Leben. Ohne deine Liebe wäre diese Arbeit niemals so entstanden!

Vielen Dank Kristin!!