

**Die Bedeutung von PDGF und PDGF-Rezeptoren für die
Fibrosierung des Myokards im Modell der
Coxsackievirus B3 (CVB3)-induzierten Myokarditis**

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Dipl.-Biologin Katja Grün
geboren am 26. Juli 1975 in Ilmenau

Gutachter:

1. Prof. Dr. med. habil. Axel Stelzner
2. Prof. Dr. rer. nat. Frank-D. Böhmer
3. Doz. Dr. rer. nat. Andreas Simm

Tag des Rigorosums: 12. Oktober 2006

Tag der öffentlichen Verteidigung: 20. November 2006

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	- 1 -
2. Einleitung	
2.1 Das Coxsackievirus B3 – ein humpathogener Vertreter der Picornaviren	- 3 -
2.2 Enteroviral induzierte Myokarditis und Dilatative Kardiomyopathie	- 6 -
2.3 Chronisch verlaufende murine CVB3-Infektionsmodelle	- 8 -
2.4 Das Mausmodell der CVB3-induzierten chronischen Myokarditis	- 9 -
2.5 Fibroblastenmitogene und Fibrosierungsprozesse	- 10 -
2.5.1 Normal- und pathologisch-verlaufende Wundheilung und Gewebereparatur	- 10 -
2.5.2 Die Rolle der Wachstumsfaktoren im Prozess der Fibroblastenproliferation	- 11 -
2.5.3 Coxsackievirus B3-induzierte Fibrosierungsprozesse	- 13 -
2.6 Die Wachstumsfaktoren der Platelet-derived growth factor (PDGF)-Familie	- 14 -
2.6.1 Gliederung der PDGF-Liganden	- 14 -
2.6.2 Die PDGF-Rezeptoren	- 14 -
2.6.3 Die Signalgebung des PDGF/PDGFR-Systems auf die Entwicklung von Zellen und Gewebe	- 16 -
2.6.4 Der Einfluss von PDGF und seiner Rezeptoren im fibrotisch verlaufenden Krankheitsgeschehen	- 18 -
2.7 Therapeutische Ansatzmöglichkeiten im Modell chronischer Fibrosierungsprozesse durch Einsatz spezifischer Tyrosinkinase-Inhibitoren	- 19 -
2.7.1 Der Protein-Tyrosinkinase-Inhibitor STI571	- 20 -
2.7.2 Inhibierende Wirkung von STI571 auf verschiedene fibrotische Prozesse	- 21 -
2.8 Zielstellung der Arbeit	- 22 -
3. Material	
3.1 Coxsackievirus B3 (Nancy)	- 23 -
3.2 Versuchstiere	- 23 -
3.2.1 Immunkompetente C57BL/6 Maus	- 23 -
3.2.2 Immundefekte MHC Klasse II (B6-Aa ⁰ /Aa ⁰) knockout Maus	- 23 -
3.3 Oligonukleotid-Primer	- 24 -
3.4 Plasmid	- 24 -
3.5 Chemikalien	- 25 -
3.6 Enzyme	- 28 -
3.7 Antikörper	- 28 -
3.8 Inhibitoren	- 29 -
3.9 Geräte	- 29 -

3.10	Puffer und Stammlösungen	- 30 -
4. Methoden		
4.1	Infektion der Versuchstiere	- 33 -
4.2	Sektion und Organentnahme	- 33 -
4.3	Histologie	- 34 -
4.4	TCID ₅₀ -Test (Tissue culture infection dose)	- 34 -
4.5	RNA-Präparation	- 35 -
4.6	Reverse Transkription	- 36 -
4.7	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)	- 36 -
4.8	Semiquantitative Polymerase-Kettenreaktion	- 36 -
4.9	Agarose-Gelelektrophorese	- 37 -
4.10	In Situ-Hybridisierung	- 37 -
4.10.1	Nachweis des CVB3-Kapsid-Protein-Gens VP1	- 37 -
4.10.2	Nachweis von PDGF-C	- 38 -
4.11	Immunhistochemischer Nachweis von PDGF-Isoformen	- 39 -
4.12	Bestimmung von PDGF-Aktivität im extrahierten Myokardgewebe	- 40 -
4.13	Detektion von PDGFR-Aktivierung mittels Immunpräzipitation	- 41 -
4.14	SDS-PAGE und Immunblot	- 41 -
4.15	Herzgewebe-Extraktion zur Analyse von STI571 (Glivec)	- 42 -
4.16	Statistik	- 42 -
5. Ergebnisse		
5.1	Erhöhte Expression von PDGF-Isoformen in der CVB3-induzierten Herzmuskelentzündung	- 43 -
5.1.1	Histologische Untersuchung von CVB3-infizierten Herzen	- 43 -
5.1.1.1	Infiltration des Myokards	- 43 -
5.1.1.2	Bewertung der Fibrose im Myokard	- 44 -
5.1.2	Expressionsmuster von Zytokinen und PDGF-Isoformen	- 48 -
5.1.2.1	Zytokinexpression	- 48 -
5.1.2.2	Expression von PDGF-Isoformen	- 51 -
5.1.3	Zelluläre Charakterisierung der CVB3-induzierten Myokardinfiltrate	- 52 -
5.1.3.1	Nachweis von PDGF-C im Myokard	- 53 -
5.1.3.2	Nachweis des viralen Genoms im Gewebeschnitt	- 55 -
5.1.4	Immunhistochemische Untersuchung des PDGF/PDGFR-Systems im entzündeten Myokardgewebe	- 57 -
5.1.4.1	Nachweis von PDGF-Faktoren im Myokard während der akuten CVB3-Infektion	- 57 -
5.1.4.2	Nachweis des PDGF/PDGFR-Systems im chronisch entzündeten Myokardgewebe	- 58 -
5.1.5	Analyse von gesteigerter PDGF-Aktivität im CVB3-infizierten Myokard	- 64 -

5.2	PDGF-Rezeptoren als mögliches Target zur Verringerung einer CVB3-induzierten Fibrosierung des Myokards	- 65 -
5.2.1	Bioverfügbarkeit und Effizienz von STI571 im Myokardgewebe	- 66 -
5.2.1.1	STI571-Konzentrationen im Myokardgewebe	- 66 -
5.2.1.2	Toxizität und Nebenwirkungen der STI571-Behandlung	- 67 -
5.2.2	Effekte der STI571-Wirkstoffbehandlung auf die Aktivität des PDGF/PDGFR-Systems	- 69 -
5.2.3	Testung von generellen Effekten der STI571-Behandlung auf kardiale Fibroblasten	- 70 -
5.2.3.1	Einfluss der STI571-Behandlung auf CVB3-Infektion	- 71 -
5.2.3.2	Effekte der STI571-Behandlung auf die Entwicklung von Fibrose im chronisch entzündeten Myokard	- 72 -
5.2.3.3	Etablierung von Indikationsmarkern einer Fibrose	- 74 -
5.2.3.4	Verminderung der PDGFR-Aktivität durch Behandlung mit STI571 in der Entwicklung von Myokardfibrose	- 76 -
6.	Diskussion	
6.1	Rolle von Immundefizienz und Viruspersistenz für die Ausbildung einer chronischen Myokarditis	- 78 -
6.2	Bedeutung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren für die Myokarditis und Fibrosierung des Myokard	- 81 -
6.3	Erhöhte PDGF-Produktion im Herzgewebe korreliert mit Infiltration und Fibrose	- 83 -
6.4	STI571/Glivec vermindert die Fibroseentwicklung im CVB3-infizierten Myokard	- 85 -
6.4.1	Verfügbarkeit des Tyrosinkinase-Inhibitors STI571 im murinen Myokard	- 86 -
6.4.2	STI571 inhibiert die PDGF-Rezeptor Aktivierung <i>in vivo</i>	- 87 -
6.4.3	Verminderte Myokardfibrosierung durch eine STI571-Behandlung	- 88 -
6.4.4	Der Einfluss weiterer Faktoren auf Fibrosierungsprozesse	- 90 -
6.5	Ausblick	- 91 -
7.	Literaturverzeichnis	- 93 -
Anhang		
Abkürzungsverzeichnis		
Bilder- und Tabellenanhang		
Danksagung		
Selbstständigkeitserklärung		

Abbildung- und Tabellenverzeichnis

Abb. 1:	Klassifizierung des Coxsackievirus B3.	- 3 -
Abb. 2:	Das Zwei-Schrittssystem der Myofibroblasten Differenzierung.	- 12 -
Abb. 3:	Rezeptor spezifische Bindung von PDGF.	- 15 -
Abb. 4:	Protolytische Reifung der PDGF-C und -D Isoformen.	- 16 -
Abb. 5:	Struktur und Wirkungsmechanismen des 2-Phenylaminopyrimidin-Derivates STI571.	- 21 -
Abb. 6:	Histologische Darstellung der Infiltrate im Myokard nach Infektion mit CVB3.	- 46 -
Abb. 7:	Nachweis von Fibrose im Myokard nach CVB3-Infektion.	- 47 -
Abb. 8:	Semiquantitative β -Aktin RT-PCR. Untersuchung einer Myokardprobe auf β -Aktin Expression unter Verwendung eines kompetitiven Kontrollfragmentes.	- 49 -
Abb. 9:	Expression von entzündungsspezifischen Zytokinen im Myokard während einer CVB3-Infektion.	- 50 -
Abb. 10:	Expression von PDGF-Isoformen während der CVB3-Infektion.	- 52 -
Abb. 11:	In Situ-Hybridisierung (ISH) von PDGF-C mRNA im Myokard nach CVB3-Infektion.	- 54 -
Abb. 12:	In Situ-Hybridisierung (ISH) des viralen Genoms im Herzmuskel nach CVB3-Infektion.	- 56 -
Abb. 13.1:	Befunde der IHC-Untersuchung von PDGF-C im myokardialen Infiltrat nach Infektion mit CVB3.	- 59 -
Abb. 13.2:	IHC-Detektion von PDGF-B im Herzgewebe nach CVB3-Infektion.	- 60 -
Abb. 13.3:	IHC-Nachweis von PDGF-A im Myokard nach Infektion mit CVB3.	- 61 -
Abb. 13.4:	Befunde der IHC-Untersuchung von PDGFR- α im Myokard nach CVB3-Infektion.	- 62 -
Abb. 13.5:	IHC-Detektion von aktiviertem Akt/PKB (p-Akt) im CVB3-infizierten Myokard.	- 63 -
Abb. 14:	Testung von Herzgewebe-Extrakten auf den Gehalt an PDGF durch Aktivierung von PDGF-Rezeptoren in Swiss 3T3 Fibroblasten <i>in vitro</i> .	- 65 -
Abb. 15:	Entwicklung und Änderung des Körpergewichtes von CVB3-infizierten MHC Klasse II ko Mäusen unter Behandlung mit 150 mg/kg, 50 mg/kg und 100 mg/kg STI571.	- 68 -
Abb. 16:	Detektion von aktivierten PDGF-Rezeptoren in Herzextrakten.	- 70 -
Abb. 17:	Nachweis von CVB3 im Herzmuskelgewebe von MHC Klasse II ko Mäusen 21 Tage nach CVB3-Infektion und Behandlung mit und ohne STI571.	- 71 -
Abb. 18.1:	Histopathologische Darstellung von Infiltrat und Fibrose im Myokard von CVB3-infizierten Mäusen unter STI571 Behandlung.	- 73 -
Abb. 18.2:	Graphische Darstellung von Fibrose im Myokard von CVB3-infizierten Mäusen unter STI571 Behandlung.	- 74 -

Abb. 19:	Expression von Fibrosemarker.	- 75 -
Abb. 20:	Immunhistochemie Detektion von aktiviertem Akt/PKB.	- 77 -
Abb. 21:	Der TGF- β -Weg.	- 91 -
Abb. 22:	Schematische Darstellung des pBluescript II KS(+) Plasmides.	Anhang
Tab. 1:	Die häufigsten durch Coxsackieviren A und B verursachten Erkrankungen.	- 4 -
Tab. 2:	Überexpression von verschiedenen Proteinen und ihrer Folgen im Myokard.	- 13 -
Tab. 3:	Expressionsanalyse der vier PDGF-Ketten im humanen Gewebe, mittels Northern Blot Analyse.	- 17 -
Tab. 4:	PDGF-Rezeptor-Tyrosinkinase Inhibitoren.	- 20 -
Tab. 5:	STI571-Konzentrationen im Herzgewebe von CVB3-infizierten und scheininfizierten MHC Klasse II knockout Mäusen.	- 67 -
Tab. 6:	Darstellung der densitometrischen Auswertung, der in Abb. 19 analysierten Argarosegel-Banden von β -Aktin, Tenascin-C und Fibronectin-Fn.	- 76 -
Tab. 7:	Verwendete Oligonukleotid-Primer	Anhang
Tab. 8:	Reagenzien für die RT-PCR	Anhang
Tab. 9:	PCR-Bedingungen	Anhang
Tab. 10:	Histologische Bewertungskriterien für das Myokard	Anhang
Tab. 11:	Antikörper-Verdünnung	Anhang
Tab. 12:	Konzentration des Tyrosinkinase Hemmstoffes STI571 im Myokard von CVB3-infizierten und scheininfizierten MHC Klasse II ko Mäusen, die 2x täglich mit 50 bzw. mit 150 mg/kg STI571 behandelt wurden.	Anhang
Tab. 13:	Körper- und Herzgewicht sowie das Verhältnis des Herz- zum Körpergewicht am Sektionstag (21 d p. i.) von CVB3-infizierten MHC Klasse II ko Mäusen, die entweder mit STI571 oder mit einer Vergleichslösung behandelt wurden, im Vergleich zu scheininfizierten Tieren, die STI571 oder die Vergleichslösung appliziert bekamen.	Anhang

1. Zusammenfassung

Humanpathogene Coxsackie B3-Viren (CVB3) sind die häufigste virale Ursache einer Myokarditis. Für das chronische Stadium dieser Erkrankung ist eine Fibrosierung des Herzmuskels kennzeichnend. Die der Fibrosierung zugrunde liegenden pathologischen Mechanismen sind bisher weder im humanen Krankheitsbild noch im murinen Tiermodell hinreichend geklärt. In Analogie zu fibrotischen Prozessen in anderen Geweben kann angenommen werden, dass die Bindegewebsvermehrung durch lokal erhöhte Spiegel von Zytokinen und Wachstumsfaktoren ausgelöst wird. Faktoren der platelet-derived growth factor-Familie (Wachstumsfaktor aus Blutplättchen/PDGF) kommen als Mediatoren dieser Prozesse in Betracht, da sie sehr potente Mitogene für Fibroblasten sind, welche im Rahmen einer Entzündung in das Gewebe einwandern.

Die Zielstellung dieser Arbeit bestand deshalb darin, die Rolle des PDGF/PDGFR-Systems, insbesondere von PDGF-C, für die der Fibrosierung zugrunde liegenden Prozesse in einem etablierten Mausmodell der CVB3-induzierten Myokarditis zu klären.

Zunächst wurde nachgewiesen, dass die wesentlichen Merkmale des unter Bedingungen der offenen Tierhaltung etablierten Modells auch unter Bedingungen der SPF-Haltung vorliegen. Eine Infektion mit CVB3-Mü/J (Nancy) induzierte in männlichen 8-12 Wochen alten MHC Klasse II knockout Mäusen nach einer akuten Myokarditis (7. Tag p. i.) mit ausgeprägten Zellinfiltraten reproduzierbar eine chronische Myokarditis mit nachfolgender Myokardfibrosierung (21. Tag p. i.). Die Erkrankung heilte in Wildtypmäusen (C57BL/6) mit identisch genetischem Hintergrund (2H^b) – ohne sichtbare histologische Spuren zu hinterlassen – aus. Die Charakterisierung des späten chronischen CVB3-Verlaufes ergab eine Zunahme von interstitiellem Bindegewebe vom 21. zum 56. Tag p. i. Die Entzündung korrelierte auch zu späten Infektionszeitpunkten mit einer Persistenz von CVB3, was über Titerbestimmungen und dem Nachweis des Virus-Kapsidgens VP1 durch RT-PCR und In Situ-Hybridisierung belegt werden konnte. Ebenfalls korrelierend mit dem Entzündungsprozess konnte die Expression der Zytokine IFN- β , IL-2, IFN- γ , IL-10, IL-12, TNF- α , IL-1 α , IL-1 β und IL-6 durch semiquantitative RT-PCR nachgewiesen werden.

Mittels RT-PCR konnte erstmals eine erhöhte Expression der mRNA der PDGF-Isoformen A, B und C in den entzündeten Herzen dokumentiert werden. Diese Befunde wurden durch den Nachweis der mRNA von PDGF-C mittels In Situ-Hybridisierung und den Nachweis von PDGF-A, -B und -C durch Immunhistochemie erhärtet. Insbesondere die detektierten Signale des PDGF-C mittels Immunhistochemie wiesen auf einen Zusammenhang von Expressionsregulierung des PDGF/PDGFR-Systems und anhaltender Virusinfektion im Myokard von MHC Klasse II knockout Mäusen hin. Die Lokalisation des PDGF-C in Infiltrationsnähe ging mit dem Nachweis des CVB3-Kapsidgenes VP1 im Myokard einher. In den entzündeten Arealen konnte ebenso der Rezeptor für PDGF-A und PDGF-C, PDGFR- α nachgewiesen werden. Die Detektion der aktivierten Akt/PKB-Kinase, welche stromabwärts

in der PDGFR-Signalkette liegt, war konsistent mit einer erhöhten Aktivität des PDGFR-Systems in den entzündeten Herzen.

Um zu prüfen, ob die Expression von Faktoren der PDGF-Familie und die Aktivierung des PDGFR-Systems kausal zur Fibrosierung der chronisch entzündeten Herzen von MHC Klasse II knockout Mäusen beiträgt, wurden Behandlungen von CVB3-infizierten Tieren mit dem oral verfügbaren, potenten und relativ selektiven PDGFR-Tyrosinkinase-Hemmstoff STI571(CGP57148B)/Glivec durchgeführt.

Voruntersuchungen ergaben, dass STI571 mit einer Applikationsdosis von 50 und 100 mg/kg für MHC Klasse II knockout Mäuse gut verträglich war und in ausreichender Menge im Myokardgewebe vorlag, um die PDGFR-Aktivität zu unterbinden. Damit erfolgte konsistent durch die STI571-Behandlung eine durch Immunhistochemie detektierbare Verringerung der entzündungsinduzierten Aktivität von Akt/PKB. Mittels des TCID₅₀-Testes konnte nachgewiesen werden, dass STI571 keinen Einfluss auf eine bestehende CVB3-Replikation im Myokard hat.

Durch Behandlung von CVB3-infizierten MHC Klasse II knockout Mäusen mit STI571 über einen Zeitraum von 20 Tage konnte eine signifikante Verringerung der Myokardfibrose erzielt werden, was qualitativ und quantitativ an Siriusrot gefärbten Myokardschnitten sichtbar gemacht werden konnte. Indikativ für eine reduzierte Bindegewebsbildung unter STI571-Behandlung war auch die verringerte Expression früher Indikationsmarker für die Fibrose (Tenascin-C und Fibronectin-Fn) was mit Hilfe der RT-PCR nachgewiesen wurde. Die erhaltenen Ergebnisse belegten somit, dass eine Applikation von STI571 mit einer Dosis 50 und 100 mg/kg gut verträglich war, keinen Einfluss auf den Virustiter im CVB3-infizierten Myokardgewebe hatte und die Fibroseentwicklung deutlich abschwächen konnte. Damit könnte der beim Menschen für die Behandlung der chronisch myeloischen Leukämie (CML) zugelassene Wirkstoff STI571/Glivec, sich als potentieller neuer Indikator für die Behandlung der chronischen Myokarditis erweisen.

2. Einleitung

2.1 Das Coxsackievirus B3 – ein humpathogener Vertreter der Picornaviren

Das humanpathogene Coxsackievirus B3 (CVB3) ist ein bedeutendes Virus aus der Familie der Picornviridae. Die Picornaviren sind unbehüllte, gegen Äther und Chloroform resistente Viren mit einer Größe von ca. 30 nm. Sie besitzen als Genom einzelsträngige, plusstrangorientierte RNA. Neben der physikalisch-chemisch-serologischen Klassifikation werden die ca. 230 bekannten Serotypen zunehmend anhand von Basensequenzen klassifiziert¹⁻³. Anhand der Säureempfindlichkeit differenziert man säurestabile Genera von säurelabilen Genera. Diese Eigenschaften haben entscheidende Konsequenzen für die Pathogenese der Viren, da säurestabile Viren ihren Wirt über den Verdauungstrakt infizieren können, indem sie das saure Magenmilieu überstehen, säurelabile Viren hingegen den Nasopharynx als Infektionsweg bevorzugen¹. Abb. 1 veranschaulicht die derzeit angewandte Systematik der Picornaviren, wodurch die Einordnung des in der Arbeit verwendeten Coxsackievirus B3 nach der derzeit gültigen Nomenklatur deutlich wird⁴.

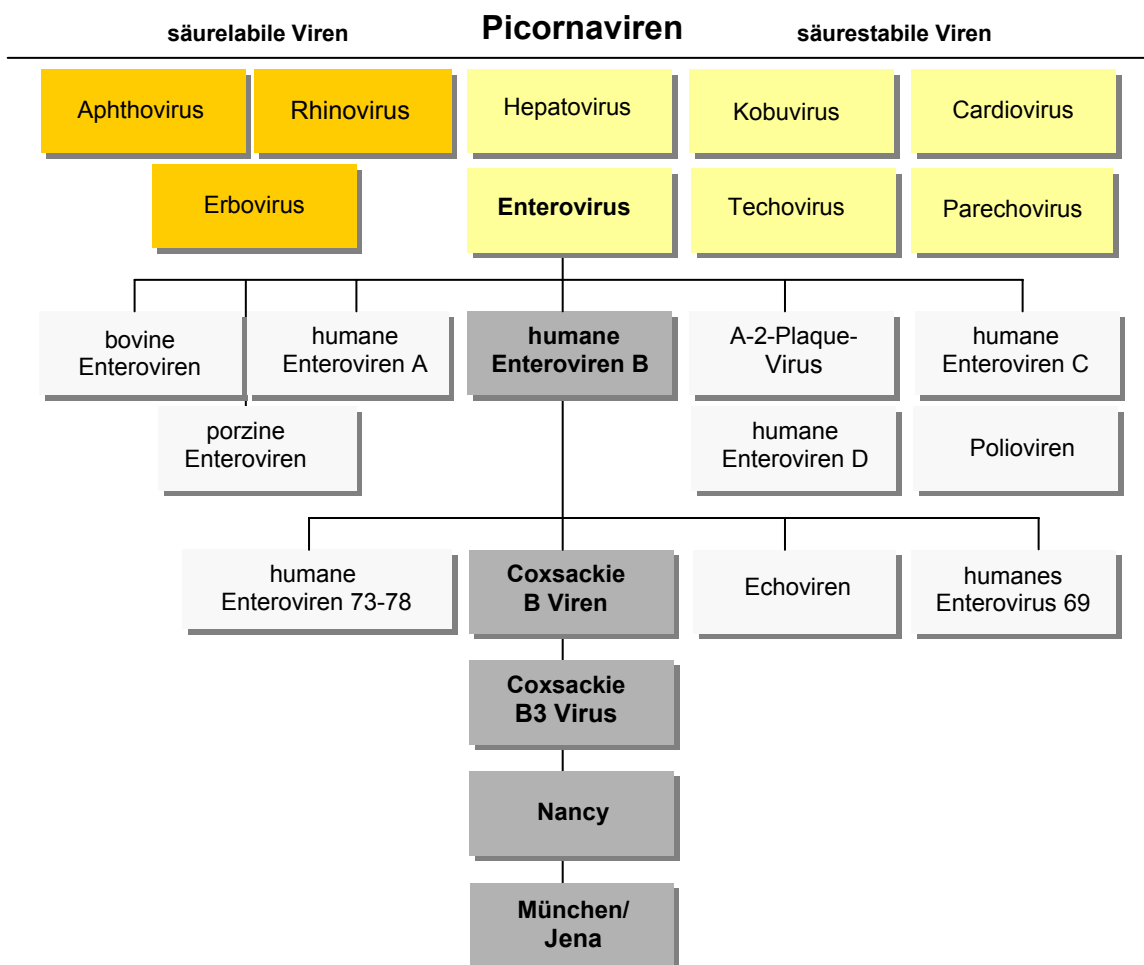


Abb. 1: Klassifizierung des Coxsackievirus B3⁴

Die Coxsackieviren gehören zu den humanen Enteroviren⁵ und werden auf Grund der beobachteten unterschiedlichen Pathogenität in neugeborenen Mäusen in die Coxsackieviren der Gruppen A und B eingeteilt⁶. Die häufigsten durch Coxsackieviren verursachten Erkrankungen sind in Tab. 1 aufgelistet.

Tab. 1: Die häufigsten durch Coxsackieviren A und B verursachten Erkrankungen²

Coxsackie-Virustyp	Erkrankungen
Typ A24	akute hämorrhagische Konjunktivitis
Typ A2-6, A8, A10, A22	Herpangina
Typ A4-6, A9, A16	Schleimhautläsionen
Typ A1-2, A4-7, A9-10, A14, A16, A22; B1-6	aseptische Meningitis
Typ A4, A7, A9, A10; B1-5	Lähmungen
Typ A4, A9; B5	Hepatitis
Typ A9-10, A16, A21, A24; B4-5	Erkrankungen des Respirationstraktes
Typ A10	Pharyngitis
Typ A18, A20-22, A24; B5	Durchfallerkrankungen bei Kindern
Typ B1-6	Fieber, grippale Infekte
Typ B1-5	Pleurodynie, Perikarditis, Myokarditis, systemische Infektionen bei Kindern, Meningoenzephalitis
Typ B5	Hautausschläge
Typ B4	Diabetes mellitus Typ-I

Das Kapsid der Picornaviren hat eine ikosaedrische Struktur. Die Seitenflächen des Kapsids werden aus je 60 Einheiten der vier Proteine VP1 bis VP4, die aus dem gespaltenen Vorläuferprotein P1 hervorgehen, gebildet. Während VP1 bis VP3 die Oberfläche des Ikosaeders bilden, ist VP4 an der Protomerinnenseite lokalisiert und mit dem RNA-Genom assoziiert⁷. Das Kapsid dient nicht nur dem Schutz der RNA, es vermittelt im Besonderen den Kontakt zu den Membranrezeptoren der zu infizierenden Zelle. Die verschiedenen Genera der Picoravirus-Familie bedienen sich unterschiedlicher Rezeptoren. So erkennen Coxsackie B-Viren gemeinsam mit den Adenoviren ein zelluläres Oberflächenmolekül, das als Coxsackievirus-Adenovirus-Rezeptor (CAR) bezeichnet wird. Einige Coxsackie B-Viren, stehen zusätzlich in Wechselwirkung mit dem Korezeptor decay-accelerating-factor (DAF). Ebenso kommen stark sulfatierte Heparansulfat-Proteoglykane (HSPG) als mögliche Rezeptoren speziell für Coxsackie B3-Viren in Frage⁸⁻¹². Nachdem das Virus an die Rezeptoren adhärirt, erfolgt über Endozytose die Penetration¹³. Durch zelluläre Polysome wird das virale Genom translatiert, indem die plusstrangorientierte virale RNA direkt als mRNA fungiert. Das Genom der Coxsackieviren besitzt mit einer Größe von ~7400 Basenpaaren einen einzigen offenen Leserahmen. Mit diesem kodiert das Virus für das schon erwähnte Polyprotein (247 kDa), in dessen Sequenz alle Proteine und Funktionen enthalten sind, die es für eine erfolgreiche Infektion benötigt¹⁴. Bereits während der Translation wird das Polyprotein proteolytisch durch in viruseigenen Proteasen 2A und 3C

prozessiert¹⁵. Eines der Translations- und Spaltprodukte ist eine RNA-abhängige RNA-Polymerase, die 3D Polymerase (3D^{pol}). Dieses Enzym synthetisiert den zum Virusgenom komplementären Negativstrang über ein kurzlebiges doppelsträngiges Zwischenprodukt, so dass der Negativstrang schnell für die Synthese von bis zu acht Positivsträngen zur Verfügung steht. Liegen ausreichend synthetisierte virale Proteine und Virus-RNA im Zytoplasma der Zelle vor, erfolgt die Aggregation der Kapsidproteine zu Prokapsiden und die virale Plusstrang-RNA wird verpackt (self assembly). Der lytischen Freisetzung der Viren geht eine Erhöhung der Plasmamembranpermeabilität voraus¹⁶⁻¹⁸. Die säurestabile Eigenschaft der Coxsackieviren gestattet einen fäkal-oralen Infektionsweg. Die Viren vermehren sich in den Peyerschen-Plaques, dem lymphatischen Gewebe des Darms. Über die ableitenden Lymphbahnen erfolgt die Abgabe in die Blutbahnen oder direkt in den Darm¹⁹. Zusätzlich ist eine lokale Vermehrung im Lymphgewebe des Nasen- und Rachenraumes durch Aerosolinfektion möglich²⁰. Die Art und Schwere einer Coxsackievirus-Infektion ist abhängig vom Virusstamm^{21,22}, vom Alter²³, Geschlecht²⁴ und vom genetischen Hintergrund des Wirtes²⁵. Von Coxsackieviren hervorgerufene Krankheiten verlaufen in 80% mild oder gar subklinisch. In ausgewiesenen Fällen können sich jedoch schwere bis fatale Verläufe entwickeln^{2,19}.

Besonders der Serotyp 3 der Coxsackie B-Viren (CVB3) kann neben einer akuten auch eine chronische Infektion des Herzmuskels hervorrufen²⁰, dessen Verlauf im Einzelfall bis hin zur dilatativen Kardiomyopathie (DCM) führen kann^{16,26}. Dennoch besitzen etwa 60-90% der Bevölkerung CVB3-Antikörper im Serum²⁷. Eine Infektion im Säuglingsalter ohne den Schutz mütterlicher CVB3-Antikörper führt zu schweren Verläufen und endet oft tödlich^{28,29}. Wie bekannt ist, werden auch 62% der aseptischen Meningitiden im Säuglingsalter durch Coxsackieviren der Gruppe B verursacht³⁰.

Die für diese Arbeit relevante CVB3-Variante „München/Jena“³¹ ist aus einem Prototyp des von Melnick isolierten, herzadaptierten Virusstammes Nancy³² hergestellt.

2.2 Enteroviral induzierte Myokarditis und Dilatative Kardiomyopathie

Unter einer Myokarditis versteht man eine Entzündung, die sich herdförmig oder diffus im Herzmuskel ausbreitet und akut oder chronisch rezidivierend verläuft. Die Diagnose Myokarditis kann derzeit nur über eine Endomyokardbiopsie und anschließender histologischer, molekularbiologisch-virologischer und immunhistochemischer Befunderhebung erstellt werden³³⁻³⁵. Die sogenannten „Dallas“-Kriterien bilden die Grundlage der histomorphologischen Einteilung einer Myokarditis³⁶⁻³⁹. Epidemiologische Daten zur Insidenz einer Herzmuskelentzündung sind nur teilweise zuverlässig, da in vielen Fällen durch einen subklinischen Verlauf von Spontanheilung ausgegangen werden muss. Männer erkranken in der Regel mit einer Quote von 2:1 häufiger als Frauen³⁴. Neben rheumatoider Arthritis kann auch der Missbrauch von Alkohol zu einer nichtinfektiösen Myokarditis führen. Als Hauptursache einer Myokard-Entzündung werden infektiöse Agenzien gesehen. Neben bakteriellen Infektionen (z. B. Salmonellen, Clostridien, Chlamydien, Borrelien und Rickettsien) können ebenso Pilze (z. B. Aspergillus, Candida und Kryptokokken) und Protozoen (z. B. Trypanosoma, Toxoplasmen, Plasmodien und Leishmanien) eine Myokarditis induzieren^{27,40-42}. Bei viralen Erkrankungen liegt der Anteil an Myokarditiden bei 3-6%⁴³. Hierbei kann die Myokarditis durch HIV⁴⁴, das Herpes-Simplex-Virus vom Typ-II, Hepatitis-C-Virus, Adenoviren⁴⁵, Cytomegalieviren⁴⁶, und das Parvovirus B19^{33,47} induziert werden. Die Einwirkung der Erreger kann direkt oder indirekt durch toxische, chemische oder physikalische Agenzien oder von bisher nicht verstandenen genetischen Ursachen beeinflusst werden⁴⁸.

Die, mit einer Insidenz bis zu 50% bei akuter Myokarditis, häufigste kardiovaskuläre Viruserkrankung wird durch Enteroviren, vor allem vom Serotyp Coxsackievirus B3, verursacht^{16,26,41}. Das Virus befällt nach hämatogener Ausbreitung Kardiomyozyten, repliziert sich aktiv im Zytoplasma und führt zu Myonekrosen. In der frühen Phase der Virusreplikation ist vor der Entwicklung eines reaktiven Entzündungsinfiltrates eine hohe Kopienzahl enteroviraler Genome nachweisbar⁴⁹. Im Anschluss bilden sich durch die Aktivierung des Monozyten-Makrophagen-Systems reaktive Entzündungsinfiltrate mit fokalen Entzündungsherden^{16,50,51}. Die enterovirale Protease 2A^{pol} induziert in kardialen Myozyten die Dystrophinspaltung, was zu einer Unterbrechung des Aktin-Zytoskelettes mit der Zellmembran und zur weiteren Ausbreitung der Infiltrate führt⁵². Die Aktivierung von T-Helferzellen (CD4), zytotoxischen T-Lymphozyten (CD8) sowie die Sezernierung ihrer spezifischen Zytokine in die Entzündungsinfiltrate im Myokard sind charakteristisch für die Ausbildung einer akuten Myokarditis und regeln die spezifische Immunantwort^{50,51}. Durch die Zunahme der humoralen und zellulären Immunantwort kann eine sich ausbreitende Infektion eingedämmt^{16,53} und das Virus vollständig aus dem Myokard eliminiert werden.

Durch bislang unbekannte Faktoren gelingt es bei einigen Fällen der Erkrankung dem Virus, sich der Überwachung des Immunsystems zu entziehen und eine persistierende, chronische Infektion auszulösen¹⁶. Diese chronische Phase der myokardialen Erkrankung wird durch ein diffuses bzw. fokales Entzündungsinfiltrat, eine myozelluläre Hypertrophie, eine nekrotische Veränderung der Myozyten und durch die Persistenz des viralen Agens charakterisiert⁵⁴. Im Vergleich zur akuten Myokarditis geht die chronische Verlaufsform mit einer eingeschränkten Virusreplikation einher. Sie ist durch eine wesentlich geringere Anzahl infizierter Myokardzellen gekennzeichnet^{51,55} und mit dem Bild einer inflammatorischen dilatativen Kardiomyopathie (DCM) gleichzusetzen^{39,56}. Die klinische Relevanz einer DCM liegt in der Tatsache begründet, dass diese mit einer jährlichen Insidenz von 5-10 Fällen/100000 Einwohnern eine der häufigsten zur Herztransplantation führende Herzerkrankung ist^{35,57}. Bei einer Diagnose DCM ist eine Mortalitätsrate von 20-40% zwei Jahre nach Diagnosestellung, zu erwarten^{38,40}. Kennzeichnend für eine DCM sind Myozytennekrosen mit reparativen fibrotischen Veränderungen des Myokardgewebes. Die interstitielle Fibrose ist durch eine massive Proliferation residenter Fibroblasten und einer erhöhten Anzahl interstitieller Zellen wie Makrophagen und Lymphozyten gekennzeichnet⁵⁸. Zudem scheint ein Ungleichgewicht von matrixdegradierenden Enzymen die Umbauprozesse der extrazellulären Matrix (ECM) auszulösen. Dies geht mit einer konsekutiven Störung der myokardialen Funktion einher⁵⁹. Die starke Persistenz von Zytokinen wie IFN- γ , TNF- α , IL-1, IL-2, IL-4 und IL-10 ist charakteristisch bei einer Persistenz der Infiltrate und Entwicklung von Fibrose. Sie kann sowohl in experimentellen Modellen von chronischer Myokarditis der Maus⁶⁰⁻⁶² als auch bei der dilatativen Kardiomyopathie von Patienten^{63,64} nachgewiesen werden. In 20-40% der Patienten mit Diagnose Myokardits oder DCM kann mittels In Situ-Hybridisierung enterovirale RNA nachgewiesen werden^{38,54}. Dies unterstreicht die Dringlichkeit der Entwicklung einer antiviralen Therapie oder einer effektiven Prävention.

2.3 Chronisch verlaufende murine CVB3-Infektionsmodelle

Der derzeitige Stand der Forschung und die jetzt bestehenden Therapiemöglichkeiten einer chronischen Myokarditis erlauben bislang nur die symptomatische Behandlung bzw. im Endstadium der Erkrankung eine Herztransplantation. Auch kann bis heute ein Fortschreiten der Fibroseentwicklung therapeutisch nicht verhindert werden. Aus diesem Grund sind Tiermodelle entwickelt worden, die sowohl akute als auch persistierende CVB3-Infektionen in verschiedenen murinen Modellen beschreiben^{54,65-71}. Zahlreiche Untersuchungen haben eine Abhängigkeit der CVB3-induzierten Myokarditis nicht nur von der Verwendung des eingesetzten Virusstammes und dessen Virulenz ausgemacht^{72,73}, sondern in besonderem Maße eine Abhängigkeit vom Immunstatus der Rezipienten Mäuse festgestellt⁷⁰. Das murine kardiale Krankheitsbild weist zwei charakteristische Phasen auf: eine akute Phase, in der die Gewebeerstörung direkt durch das zytolytisch wirkende Virus bzw. durch die gegen das Virus gerichteten Abwehrmechanismen erfolgt^{50,72} und eine chronische Phase, die durch fortschreitende Fibrose im Myokard gekennzeichnet ist.

Für die Untersuchung des chronischen Verlaufes einer Herzmuskelentzündung im murinen Modell eignen sich Mausmodelle wie A.CA/SnJ, A.BY/SnJ und SWR/J. Bei diesen Mäusestämmen ist die Chronizität der Herzerkrankung mit einer Persistenz viraler RNA im Myokard verbunden^{72,74}. Tiermodelle wie NMRI-Mäuse stehen wegen ihrer genetischen Vielfalt in der Heterogenität der humanen Population sehr nahe. Dieses Mausmodell entwickelt nach einer Infektion mit der lytischen CVB3-Variante 31-1-93 eine chronische Myokarditis mit ausgeprägter Fibrose und Nekrose in den Entzündungsarealen^{66,75}. Beinhaltet die Fragestellung im chronisch verlaufenden myokardialen Krankheitsgeschehen die Aufklärung bestimmter Immunmechanismen, dann finden knockout Mäuse, denen bestimmte Komponenten des Immunsystems fehlen, Verwendung^{53,72}. So entwickeln BALB/c Mäuse, die kein CD40 Gen⁷⁶ aufweisen, eine chronische Myokarditis mit nachfolgender Fibrose, während immunkompetente Wildtypmäuse eine akute Myokarditis mit anschließender vollständiger Heilung ausbilden⁷⁷. Ähnliche Ergebnisse zeigen Experimente mit C57BL/6 Mäusen, denen das Zytokin IL-4⁷⁸ für den Aufbau einer effektiven TH-2 vermittelnden Immunantwort fehlt. Bei 50% diese Tiere geht die Erkrankung in eine chronischen Myokarditis mit starken myokardialen Schäden und Persistenz des CVB3 im Herzmuskel über⁷⁹. BALB/c Mäuse mit einem identischen Immundefekt hingegen zeigen keine chronische Entzündung, sondern heilen nach einer akuten Myokarditis aus⁸⁰. B-Zell-defizienten Mäusen (μ MT-ko)⁸¹ mit fehlender IgM- und IgG-Antikörperantwort weisen nach CVB3-Infektion eine stete Viruslast im Myokard auf, welche zu einer Entwicklung einer schwere Myokarditis mit großen Infiltraten und Fibrose führt, an denen die Mäuse versterben⁸². Der Verlust der β 2-Mikroglobulin-Expression in C57BL/6 Mäusen führt nach Virusinfektion zu einem geringen neutralisierenden Antikörper- und virusspezifischen IgG-

Spiegel sowie zu einer verringerten Produktion von protektiven Zytokinen, wie z. B. Interferon- γ , was zu einer persistierenden Entzündung und kardialer Fibrose führt⁶⁹. Die für diese Arbeit verwendeten C57BL/6 knockout Mäuse, denen das Gen für MHC Klasse II⁸³ fehlt, entwickeln eine schwere, chronisch verlaufende Myokarditis, die viele Parallelen zum humanen Krankheitsbild der DCM aufweist⁷¹.

2.4 Das Mausmodell der CVB3-induzierten chronischen Myokarditis

Im Rahmen der Charakterisierung protektiver bzw. pathogenitäts-begünstigender Eigenschaften des Immunsystems auf den Krankheitsverlauf einer CVB3-induzierten Myokarditis sind immundefiziente MHC Klasse II knockout Mäuse⁸³ mit der Virusvariante München/Jena (CVB3 Mü/J) des Stammes CVB3 (Nancy) infiziert und mit immunkompetenten C57BL/6 Mäusen (identischer genetischer Hintergrund; H-2^b) verglichen worden^{71,79}. CVB3 induziert in C57BL/6 Mäusen eine akute Myokarditis mit ausgeprägten Zellinfiltraten, die drei Wochen nach Infektion zur Ausheilung kommt. Im Unterschied zu immunkompetenten Mäusen zeigen histologische Untersuchungen des Myokards CVB3-infizierter MHC Klasse II knockout Mäusen, die resultierend aus ihrem Gendefekt eine stark verringerte Anzahl peripherer CD4⁺-T-Zellen aufweisen, eine chronische Myokarditis mit starker Fibrosierung des Herzmuskels sowie ausgeprägte Areale von Entzündungszellen, die hauptsächlich aus CD11b⁺-Zellen und CD8⁺-T-Zellen bestehen. Der Virustiter ist am 7. Tag p. i. im Myokard beider Mäusestämme identisch. C57BL/6 Mäuse eliminieren bis zum Tag 14 p. i. das infektiöse Virus aus dem Myokard. Im Gegensatz dazu persistiert das Virus im Myokard von MHC Klasse II defizienten Mäusen bis zum 56. Tag p. i. (derzeit letzter untersuchter Zeitpunkt). Viruspezifische Antikörper der Immunglobulinklasse IgM wurden unabhängig von funktionellen CD4⁺-T-Zellen gebildet. MHC Klasse II knockout Mäuse zeigen bis zum 21. Tag p. i. weder einen Anstieg der viruspezifischen IgG-Antikörper noch konnten virusneutralisierende Antikörper nachgewiesen werden. Aus den bisherigen Untersuchungen geht hervor, dass ein Defekt im Bereich der MHC Klasse II Präsentation und das daraus resultierende Fehlen funktionsfähiger CD4⁺-T-Zellen eine konstante Viruspersistenz im Myokard zur Folge hat. Als Konsequenz kommt es reproduzierbar zur Entwicklung einer chronischen Myokarditis mit nachfolgender progressiven Fibrosierung. Dieses Modell erscheint daher besonders geeignet, Mechanismen und Effektoren des Fibrosierungsprozesses zu analysieren.

2.5 Fibroblastenmitogene und Fibrosierungsprozesse

Fibroblasten können in vielen Organen von Wirbeltieren gefunden werden und assoziieren mit verschiedenen Formen von Bindegewebe⁸⁴. Fibroblasten sind mesenchymalen Ursprungs und haben die Funktion der Bildung interstitiellen Kollagens, vor allem vom Typ I, III und IV⁸⁵. In einem Myokardgewebe stellen Kardiomyozyten mit ca. 75% den Hauptanteil des Gewebevolumens. Ihre Zellanzahl beträgt jedoch nur zwischen 30-40%. Die Mehrheit der restlich identifizierten Zellpopulationen ist überwiegend Fibroblasten. Fibroblasten umgeben die Kardiomyozyten und bilden so „Brücken“ zwischen verschiedenen Myokardschichten. Die Interaktion zwischen kardialen Fibroblasten und kardialen Myozyten scheint für den Prozess des Umbaus von Herzmuskelgewebe essentiell zu sein⁸⁶. Die Bildung von Kollagen im Myokard eines gesunden Erwachsenen ist relativ gering. Der Anteil des durch Fibroblasten gebildeten Netzwerkes im Myokardgewebe steigt mit zunehmenden Alter an⁸⁵.

2.5.1 Normal- und pathologisch-verlaufende Wundheilung und Gewebereparatur

Fibroblastenproliferation und Geweberemodelling sind Hauptmerkmale eines normalen Wundheilungsprozesses. Im physiologischen Verlauf der Wundheilung im adultem Organismus sind Fibroblasten maßgeblich an der Synthese der extrazellulären Matrix (ECM) beteiligt. Sie wandern in die Wunde ein und produzieren eine Kollagen- und Fibronectinreiche ECM⁸⁷. Wenige Stunden nach Gewebeerletzung treten erste Zellen, wie Neutrophile, im zerstörten Gewebe auf, gefolgt von Monozyten und Lymphozyten. Substanzen wie Histamine und TNF- α werden durch einwandernde Makrophagen freigesetzt und induzieren in Monozyten die IL-6-Sekretion. Während dieser akuten Phase wird das zerstörte Gewebe durch Degradation und Produktion von Matrixbestandteilen und Angiogenese umgebaut⁸⁶. In dem entzündeten Gewebe angereicherten Makrophagen, Mastzellen und Thrombozyten geben zudem eine Reihe von Wachstumsfaktoren (EGF, IGF-1, PDGF, TGF- β) und Zytokine (IL-1, IL-6, TNF- α) ab, die chemotaktisch die Proliferation von residenten Fibroblasten anregen können⁸⁸. Diese Faktoren stimulieren ebenso die Synthese von Proteoglykan und Kollagen-Typ III, die den raschen Umbau in ein kapillarreiches Bindegewebe zulassen. Das neu entstandene Bindegewebe vom reißfesteren Kollagen-Typ I stellt seine mitotische Aktivität ein. Es bildet sich ein faserreiches, zellarmes und kapillararmes Narbengewebe, welches das ehemalige ortsständige defekte Gewebe ersetzt hat^{85,86}. Bei länger anhaltenden retraktiven Vorgängen, wie chronischen Gewebeentzündungen, kommt es zu weiteren Fibroblastenproliferationen. Diese Fibrosierung eines Organs kann als Ergebnis einer überschießenden und letztlich deregulierten Wundheilung bei fortgesetzter Schädigung aufgefasst werden. Unter Ersatz des kontinuierlich geschädigten Gewebes entsteht eine irreversible Narbe, welche zwar den

Organerhalt gewährleistet, aber eine Minderung der Funktionsleistung des Organs verursacht.

In einer Vielzahl von Organen wie Lunge, Leber, Niere, Darm, Herz, Haut und Knochenmark können fibrotisch verlaufende Prozesse dokumentiert werden. Für Fibrosierungen scheint eine bestimmte Klasse von Fibroblasten, die so genannten „Myofibroblasten“ von besonderer Bedeutung zu sein. Myofibroblasten zeichnen sich durch ein ausgeprägtes Aktin-Zytoskelett, eine vermehrte Motilität und Kontraktilität, eine hohe Proliferationsrate und eine exzessive Synthese von Komponenten der ECM aus⁸⁹. Die zelluläre Herkunft der Myofibroblasten ist derzeit in der Literatur Gegenstand zahlreicher Diskussionen. Favorisiert wird die Hypothese der Umwandlung von Fibroblasten in Myofibroblasten durch eine wachsende Fibrinolyseaktivität (Plasminogen-Aktivator-Enzyme) im pathologisch veränderten Gewebe^{87,90}. Myofibroblasten sind große spindel-, oft sternförmige Zellen. Im Gegensatz zu anderen Fibroblasten bilden ihre Aktin-Mikrofilamente kein kortikales Netzwerk längs der Zellmembran, sondern sind entlang der langen Zellachse lokalisiert. Die Filamente sind schmaler als in den glatten Muskelzellen⁸⁷. Für eine Differenzierung der Myofibroblasten aus Fibroblasten spricht der Nachweis von Vimentin und Myosin sowohl in Fibroblasten als auch in Myofibroblasten. Das Fehlen von Proteinen, wie Lamin und Desmin in Myofibroblasten, die für die glatten Muskelzellen charakteristisch sind, unterstützen diese These^{85,91}. Abb. 2 zeigt die Differenzierung eines Fibroblasten in einen Myofibroblasten in einem Zwei-Schrittssystem⁸⁷.

2.5.2 Die Rolle der Wachstumsfaktoren im Prozess der Fibroblastenproliferation

In allen fibrotischen Erkrankungen spielen Myofibroblasten eine wichtige Rolle. Der Myofibroblast kann auto- und parakrin fibrogene Wachstumsfaktoren sezernieren und unterhält die Fibrogenese im jeweiligen Organ, indem die Differenzierung von Fibroblasten in Myofibroblasten weiter gefördert wird⁸⁷.

Der Wachstumsfaktor aus Blutplättchen (PDGF) scheint eine mitogene Schlüsselposition in der Differenzierung der Myofibroblasten einzunehmen und wirkt chemotaktisch auf diesen Zelltyp⁸⁹. Weiterhin wird durch PDGF die Produktion von Kollagen durch Fibroblasten stimuliert⁹².

Ein weiterer wichtiger Mediator im Prozess von Wundheilung und Fibrose ist der transformierende Wachstumsfaktor-beta (TFG- β). TGF- β ist an multiplen Funktionen wie Zellwachstum, Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Induktion von Apoptose im Organismus beteiligt⁹³. Es existieren drei Isoformen von TGF- β . Als zelluläre Rezeptoren fungieren transmembrane Serin/Threonin-Kinasen. Für die Aktivierung des Komplexes ist die Phosphorylierung der Rezeptoren erforderlich. Nachfolgend werden auf der zytoplasmatischen Seite der Membran Proteine der Smad-Familie phosphoryliert. Rezeptor-

spezifische Smad-Moleküle – Smad2/3 – bilden nachfolgend mit Smad4 ein Heterodimer und fungieren als Transkriptionsfaktoren^{86,93,94}. Neue Studien belegen, dass durch TGF- β auch unabhängig vom Smad2/3-Weg Signale über den c-Abelson-Tyrosinkinase-Weg (c-Abl) vermittelt werden können. Die Aktivierung der c-Abl-Kinase durch TGF- β geschieht dabei unabhängig von der Phosphorylierung des PDGF-Rezeptors oder dessen Expression^{95,96}. TGF- β wirkt chemotaktisch auf Monozyten, Fibroblasten und Makrophagen und nimmt auf diesem Weg Einfluss auf die Produktion von Kollagen und Fibronectin sowie auf die Inhibition der Kollagen-Degradation^{86,97}. Ebenso vermag TGF- β in diesen Zellen die eigene Expression sowie die von IL-1, IL-6, TNF- α und PDGF zu aktivieren⁹³.

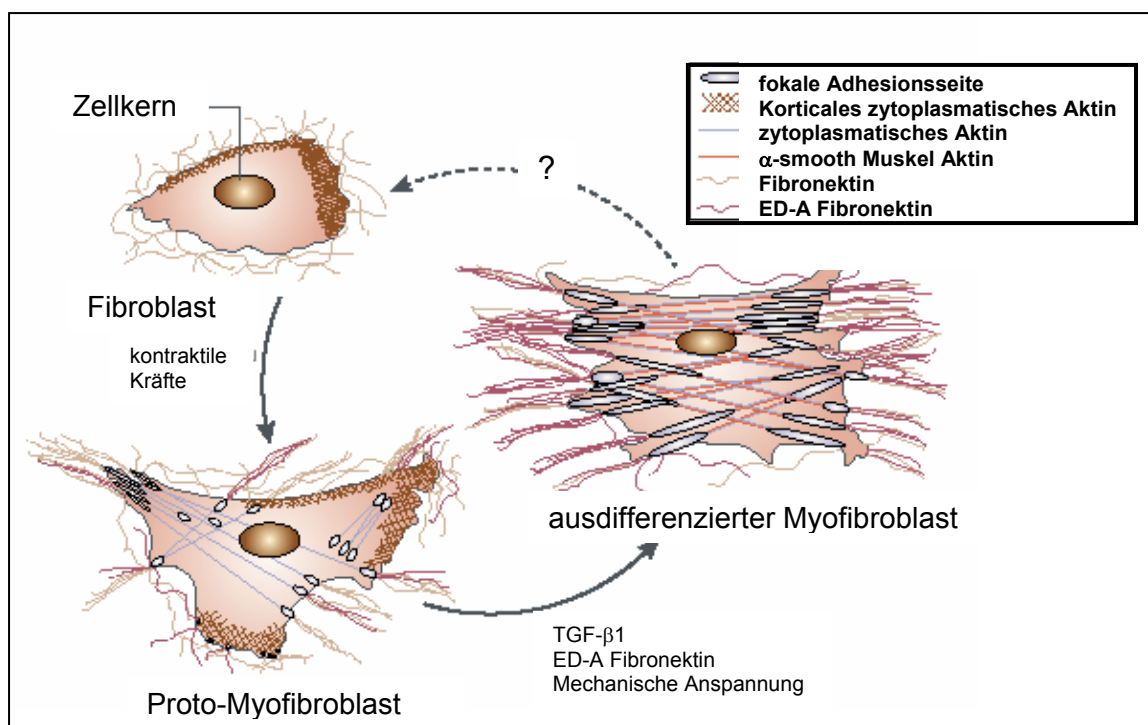


Abb. 2: Das Zwei-Schrittssystem der Myofibroblasten Differenzierung. Unter Stresseinwirkung erfolgt eine Differenzierung des Fibroblasten in einen Proto-Myofibroblasten. Durch Erhöhung von Wachstumsfaktoren wie TGF- β und PDGF kommt es zu einer verstärkten Expression von Fibronectin. Dies bewirkt die Modulation des Proto-Myofibroblasten in einen ausdifferenzierten Myofibroblasten⁸⁷.

2.5.3 Coxsackievirus B3-induzierte Fibrosierungsprozesse

Fibrosierungen des Myokards können offenbar über verschiedene Mechanismen ausgelöst werden. Im Fall der Coxsackievirus B3-induzierten chronischen Myokarditis mit Entwicklung einer massiven Fibrose ist es eine noch nicht endgültig geklärte Frage, ob die Virusinfektion des Myokards selbst für die Progression der Erkrankung verantwortlich ist. Alternativ könnten die vom Virus induzierten Immunmechanismen oder die Ausbildung einer Autoimmunität zum Fortschreiten von myokardialen Umbauprozessen führen. Für die Hypothese einer Viruspersistenz spricht, dass selbst die Expression einer Coxsackie B3-cDNA im Myokard, die Entwicklung des typischen Bildes einer myokardialen Fibrose auslösen kann^{98,99}. Bei einigen Mausmodellen der CVB3-induzierten chronischen Myokarditis bzw. DCM bei Patienten lassen sich jedoch Antikörper gegen kardiales Myosin nachweisen^{50,100,101}. Es wäre denkbar, dass sich in Folge einer Virusreplikation und des Gewebeuntergangs im Myokard parallel zu den reparativen Prozessen, ein Autoimmunprozess aufbaut. Als mögliches Autoantigen könnte kardiales Myosin wirken, das in suszeptiblen Mäusestämmen eine Myokarditis mit Entzündungsinfiltraten induziert, wobei es auch zur Bildung von Myosinspezifischen Antikörpern kommt^{102,103}. Bekannt ist auch, dass durch eine kardiale Überexpression verschiedener Zytokine und Wachstumsfaktoren (Tab. 2) die Proliferation der Fibroblasten im Myokard stimuliert werden kann und dies zu einer Myokarditis und Fibrose führt.

Tab. 2: Überexpression von verschiedenen Proteinen und ihrer Folgen im Myokard

überexprimierendes Protein	ausbildender Phänotyp	Referenz
murines TNF- α (stark)	Myokarditis, Kardiomegalie, letal	104
murines TNF- α (schwach)	diffuse, milde, interstitielle Infiltrate, 23% Letalität nach 6 Monaten	105
murines TNF- α	Myokarditis, Fibrose, Herzversagen	106
CVB3, Replikationszyklus gehemmt	Fibrose, Herzversagen	99
Grün fluoreszierendes Protein (GFP)	erhöhtes Herz/Körpergewicht, Herzdilatation, Herzversagen, Tod bei starker Expression, keine Entzündung, keine Fibrose	107
humanes IL-1	Tiere überleben maximal 14 Tage, Hypertrophie von kardialen Myozyten, Lungenödeme	108
murines PDGF-C	Geschlechtsspezifische Unterschiede: Weibchen: schwerer Befall, dilatative Kardiomyopathie, Herzinfarkt, plötzlicher Tod Männchen: hypertrophischer Phänotyp, massive Fibrose, zusätzlich Leberfibrose und Leberkarzinome	109,110
murines TGF- β	erhöhtes Herz/Körpergewicht, erhöhte Kollagen-Typ I und III Produktion, Anstieg von MMP's und TIMP's dadurch Entstehung einer myokardialen Fibrose.	111

2.6 Die Wachstumsfaktoren der Platelet-derived growth factor (PDGF)-Familie

Der Platelet-derived growth factor (PDGF/Blutplättchenwachstumsfaktor) gehört in die Gruppe der Wachstumsfaktoren und ist ursprünglich in Blutplättchen gefunden worden, die ihn bei der Blutgerinnung über sekretorische Vesikel freisetzen¹¹².

2.6.1 Gliederung der PDGF-Liganden

Der Begriff „Platelet-derived growth factor“ bezeichnet eine Familie von homo- bzw. heterodimeren Wachstumsfaktoren, die aus zwei über Disulfidbrücken verknüpften Polypeptiden bestehen und wichtig für das Wachstum, Überleben und die Funktion verschiedener Bindegewebsarten sind¹¹³. Es existieren mehrere PDGF-Isoformen A, B, C und D¹¹⁴⁻¹¹⁸, wobei die Bildung von Homodimeren AA, BB, CC, DD gegenüber der heterodimeren Isoform AB bevorzugt zu sein scheint. Die reifen PDGF-Isoformen A und B bestehen aus ungefähr 100 AS, mit acht stark konservierten Zysteinen, wobei zwei für die Disulfidbrücken zwischen den jeweiligen Untereinheiten verwendet werden¹¹⁹. Die Gene der PDGF-Isoformen A und B sind auf den Chromosomen 7 und 22 lokalisiert¹²⁰. Die kürzlich neu beschriebenen PDGF-Isoformen C und D besitzen zusätzlich in ihrem Aufbau eine so genannte CUB-Domäne (Abb. 4), die durch limitierte Proteolyse abgespalten wird. PDGF-C und -D werden somit aus latenten Vorstufen in aktive Liganden umgewandelt^{118,121}. Die Isoformen C und D bestehen aus ca. 350 AS^{117,122}. Für die PDGF-Isoformen C und D befinden sich die Gene auf den Chromosomen 4 und 11¹²³ und kodieren für 6 bzw. 7 Exons. In Abb. 3 ist die Bindungsspezifität der fünf PDGF-Isoformen dargestellt. Diese weisen unterschiedliche Bindungseigenschaften zu den PDGF-Rezeptor-Isoformen auf.

2.6.2 Die PDGF-Rezeptoren

Als zelluläre Rezeptoren aller PDGF-Isoformen fungieren zwei Rezeptor-Isoformen, PDGFR- α (170 kDa) und PDGFR- β (180 kDa). Diese Rezeptoren gehören zu den transmembranen Tyrosinkinase und sind strukturell mit dem CSF-1R (Makrophagen-Kolonie-Stimulations-Faktor 1 Rezeptor), c-Kit/SCFR-Rezeptor (Stammzell-Faktor-Rezeptor) und Flt3 (FMS-ähnliche Tyrosinkinase III) verwandt^{116,124,125}. Die Lokalisation der Rezeptor-kodierenden Gene ist auf den Chromosomen 4 (PDGFR α)¹²⁶ und 5 (PDGFR β)¹²⁷. Die Struktur der Rezeptoren ist durch eine extrazelluläre Domäne, eine intrazelluläre Domäne (die eine Insertionssequenz hat) und eine transmembrane Domäne gekennzeichnet. Die im extrazellulären Teil befindlichen Immunglobulin-ähnlichen Domänen (Ig-ähnliche Domäne) sind für die Bindung des Liganden, vermittelt durch die drei außen liegenden Ig-ähnlichen Domänen, verantwortlich. Eine vierte Ig-ähnliche Domäne der Rezeptoren, ebenfalls ein

extrazelluläres Strukturmotiv, dient offenbar wesentlich der Dimerisierung des Rezeptors und ist somit direkt am Prozess der Rezeptor-Rezeptor-Interaktion beteiligt¹²⁸. Essentiell für die Funktion der PDGF-Rezeptoren ist die Aktivierung der intrazellulären Tyrosinkinase-Domäne des Rezeptors. Diese erfolgt nach der Ligandenbindung durch die Bildung von Rezeptordimeren und die gegenseitige Phosphorylierung der Rezeptormoleküle (Autophosphorylierung)^{125,129}. Die Funktionseinheiten der Rezeptoren sind Homodimere mit den Isoformen $\alpha\alpha$, $\beta\beta$ sowie $\alpha\beta$ als Heterodimere-Isoform¹²⁵. Die verschiedenen Liganden-Isoformen weisen dabei unterschiedliche Affinität zu den Rezeptor-Isoformen auf. Während die PDGF-Isoform BB an alle Rezeptor-Isoformen binden kann, vermögen PDGF-AA und PDGF-C nur an den PDGFR- α bzw. PDGF-D nur an den PDGFR- β zu binden, siehe Abb. 3^{115,118,121,130}.

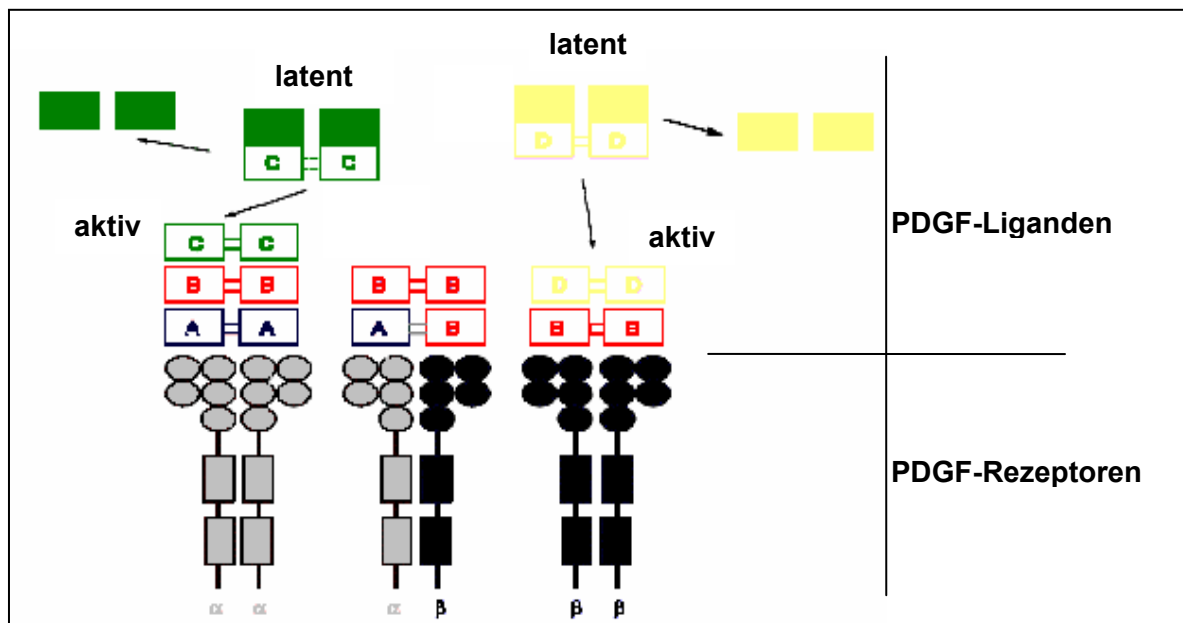


Abb. 3: Rezeptor spezifische Bindung von PDGF. Die fünf PDGF-Isoformen binden und aktivieren spezifisch die homo- bzw. heterodimeren PDGF α - oder PDGF β -Rezeptoren¹³¹.

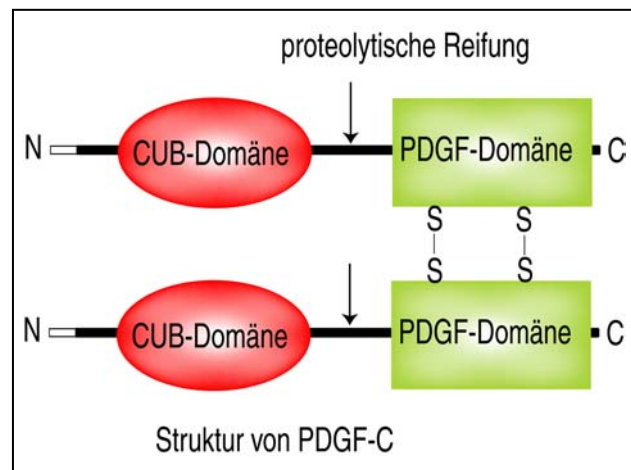


Abb. 4: Proteolytische Reifung der PDGF-C und -D Isoformen. Schematische Darstellung der PDGF-C und PDGF-D C-terminalen Wachstumsfaktor-Domäne und der N-terminalen CUB-Domäne, die durch extrazelluläre Proteasen abgelöst wird¹³².

2.6.3 Die Signalgebung des PDGF/PDGFR-Systems auf die Entwicklung von Zellen und Gewebe

Sowohl die homo- als auch die heterodimeren Formen der PDGF-Rezeptoren und die PDGF-Liganden sind während der embryonalen Entwicklung an der Differenzierung und Ausbildung verschiedener Organe beteiligt und können im adulten ausdifferenzierten Gewebe nachgewiesen werden¹¹⁶. Tab. 3 gibt einen Überblick über die Expressions-Analyse der vier PDGF-Ketten im adultem humanen Gewebe und zeigt eine weite Verbreitung der PDGF's¹³². PDGF-A mRNA ist vor allem im Herz, im Pankreas und in der Skelett-Muskulatur besonders hoch exprimiert. Die PDGF-B Isoform wird in vielen Organen exprimiert, hauptsächlich jedoch im Herz und in der Plazenta¹¹⁶. Besonders gut untersucht sind die auf zellulärer Ebene basierenden Expressionsnachweise von PDGF-A und -B¹¹⁶. PDGF-C mRNA kann im humanen Geweben mannigfaltig nachgewiesen werden, so in einem hohen Expressionsspiegel im Herz, in der Niere, im Pankreas sowie in moderatem Niveau in der Leber, in der Testis, im Gehirn und in den Ovarien. In der Milz, im Kolon und in peripheren Blutleukozyten konnte PDGF-C nicht detektiert werden^{114,117,122}. Ebenso ist eine Koexpression von PDGF-Rezeptor und dem zugehörigen PDGF-Liganden in einigen Geweben beobachtbar. Die PDGF-Isoformen A und C, beide PDGF- α Rezeptor-Liganden sind, wie PDGFR- α im Herz, im Gehirn, in der Niere und in der Testis exprimiert. Die Expression der PDGF-Liganden im Mausmodell weist zum humanen System eine hohe Ähnlichkeit auf¹³². Die Expression des „jüngsten“ Mitgliedes der PDGF-Familie, PDGF-D, einem Liganden des PDGF- β Rezeptors, ist im humanen Gewebe im Vergleich zu den anderen PDGF-Ketten weniger stark verbreitet¹³². Ein Nachweis ist jedoch im Herz und in der Niere möglich¹¹⁸, weiterhin im Pankreas, im adipösem Gewebe, im Magen, in Ovarien

und in der Testis sowie in vaskulären Gefäßen^{117,123}. Während der embryonalen Entwicklung sind die PDGF-Ketten A und B sowie die PDGF-Rezeptoren an verschiedenen epithelial-mesenchymalen und vaskulären Interaktionen beteiligt¹¹⁶. PDGF-C hat in der embryonalen Entwicklung großen Einfluss auf neurale und mesenchymale Gewebe^{114,133}, z. B. synthetisieren Kardiomyozyten während der embryonalen Entwicklung PDGF-C¹¹⁴. PDGF-D kann im embryonalen Gewebe im Herz, in der Lunge, in der Niere und in einigen Muskelderivate gefunden werden¹³². Dass mesenchymale Zellen in der embryonalen Entwicklung auf das PDGF/PDGFR-System angewiesen sind, zeigen die Phänotypen von PDGF-A, -B sowie PDGF- α und - β Rezeptor knockout Mäusen^{134,135}. Eine Inaktivierung der PDGF-B Kette bzw. des PDGFR- β führt zu schweren Störungen in der Bildung der Blutgefäße und der Niere. Dieser Phänotyp erlaubt kein Überleben, die Mäuse sterben zumeist im Uterus oder kurz nach der Geburt¹³⁶⁻¹³⁸. Bei PDGF-A null Mutanten sterben 50% der Embryonen im Uterus bis zum 10. Tag der Embryogenese ab, diejenigen, die bis etwa drei Wochen nach der Geburt überleben, weisen einen abnormalen postnatalen Phänotyp in Lunge, Haut und Nervensystem auf^{123,139}. Bei PDGFR- α knockout Mäusen treten kardiovaskuläre und skelettale Defekte auf, welche ebenfalls zum Absterben der Embryonen führen¹⁴⁰.

Tab. 3: Expressionsanalyse der vier PDGF-Ketten im humanen Gewebe, mittels Northern Blot Analyse¹³²

Organ	PDGF-A	PDGF-B	PDGF-C	PDGF-D
Herz	+++	+++	++	++
Gehirn	++	+	+/-	-
Plazenta	++	+++	+	+/-
Lunge	++	+++	+/-	-
Leber	+	+	+++	+/-
Skelett-Muskel	+++	+++	++	-
Niere	++	+++	+++	+
Pankreas	+++	++	+++	+++
Milz	-	++	-	+/-
Thymus	-	+/-	+	+
Prostata	++	++	++	++
Testis	+	++	++	+++
Ovarien	+/-	+++	+++	+++
Dünndarm	++	++	+	+
Dickdarm	+	+	-	+

2.6.4 Der Einfluss von PDGF und seiner Rezeptoren im fibrotisch verlaufenden Krankheitsgeschehen

Eine Veränderung des PDGF-vermittelten Signalweges kann zu einer Vielzahl von Erkrankungen in unterschiedlichen Organen führen. Faktoren der PDGF-Familie nehmen durch ihre chemotaktische Anziehung auf Myofibroblasten während der Pathogenese von fibrotischen Erkrankungen vermutlich eine Schlüsselrolle ein^{89,141}. Eine besondere Rolle des PDGF/PDGFR-Systems konnte durch verschiedene Arbeitsgruppen im Prozess der Fibroseentwicklung an Lunge und Niere dargestellt werden. Die systematische Applikation von PDGF-B in Ratten führte zu einer strukturellen Proliferation pulmonarer Stomazellen und zu Kollagen-Deposition in der Lunge¹⁴² sowie zu einer interstitieller Fibrose in der Niere¹⁴³. Beim Menschen wurde im Fall der durch Asbest oder Kohlestaub induzierten Lungenfibrose eine stark erhöhte Expression von PDGF-A und -B Genen nachgewiesen^{142,144-146}. Eine kritische Rolle konnte für die Proliferation von Mesangium-Zellen im Fall der experimentell induzierten Glomerulonephritis in Ratten gezeigt werden. Die Gabe von neutralisierenden Antikörpern gegen PDGF führte *in vivo* zu einer deutlichen Reduktion der Mesangium-Zellproliferation und Matrix-Deposition¹⁴⁷. In der interstitiell induzierten Nierenfibrose bei Ratten konnte durch die Gabe von spezifischen PDGF-Rezeptorblockern eine Herabsetzung der Fibrosierung nachgewiesen werden¹⁴⁸. PDGF könnte im Kontext chronischer Entzündungen offenbar sowohl als direkter Aktivator der Fibroblastenproliferation als auch im Zusammenspiel mit anderen Wachstumsfaktoren und Zytokinen wirken. TGF- β z. B. stimuliert die PDGF-Expression in Monozyten¹⁴⁹, die Kombination von TGF- β und TNF- α induziert synergistisch die PDGF-Expression in Astrocyten¹⁵⁰, IL-1 steigert die Expression von PDGF-Rezeptoren in Lungenfibroblasten¹⁵¹ und PDGF stimuliert synergistisch mit Glukose die Expression von TGF- β in der Niere¹⁵². Über die kürzlich neu beschriebenen PDGF-Isoformen C und D ist noch relativ wenig hinsichtlich ihrer Beteiligung an fibrotischen Prozessen bekannt. Die Isoform PDGF-C jedoch scheint an der Steuerung von pulmonarer und kardialer Fibrose beteiligt zu sein^{109,153}. Ebenso weiß man, dass sowohl PDGF-C als auch PDGF-D an der Entwicklung von renaler Fibrose beteiligt sind^{154,155}.

Untersuchungen zur Rolle des PDGF-Systems für die Fibrosierung im Fall der chronischen Myokarditis sind nach bisherigem Kenntnisstand nicht erfolgt. Jedoch könnte z. B. eine Überexpression eines der PDGF-Liganden als mögliches potentes Mitogen wirken. So ist bereits dargelegt worden, dass eine Überexpression von PDGF-C in transgenen Mäusen zu einer massiven Fibrose im Myokard führt¹²¹. Parallel dazu entwickeln diese Mäuse eine Leberfibrose sowie zelluläre Leberkarzinome¹¹⁰. Die Überexpression von PDGF-C resultiert in einer geschlechtsspezifischen Ausbildung der Myokardfibrose. So entwickeln die weiblichen Mäuse eine letale Form der dilatativen Kardiomyopathie, wohingegen die männlichen Mäuse einen mehr progressiven hypertrophischen Phänotyp mit Myokardfibrose

ausbilden¹⁰⁹. Diese Studien vermitteln neue Einblicke in die Rolle des PDGF-C und bestätigen das Potential des PDGFR- α zur Auslösung kardialer Fibrose. Dies war bereits auf Grundlage dessen vermutet worden, dass PDGF-A als besonders potentes Mitogen für isolierte Herzfibroblasten wirkt¹⁵⁶.

2.7 Therapeutische Ansatzmöglichkeiten im Modell chronischer Fibrosierungsprozesse durch Einsatz spezifischer Tyrosinkinase-Inhibitoren

Möglichkeiten zur experimentellen Ausschaltung des PDGF/PDGFR-Systems bestehen auf der Ebene der Ligandenbindung, der Rezeptordimerisierung, der Tyrosinkinase-Aktivität oder der „stromabwärts“ gelegenen Schritte der Signaltransduktion¹²⁵. Von der Arbeitsgruppe um A. Östman ist ein Blockadensystem der Ig-ähnlichen Domäne-4 des PDGF-Rezeptors beschrieben worden. Die isolierte, lösliche, Ig-ähnliche Domäne-4 verhindert bei Zugabe zu Zellen mit intaktem PDGF-Rezeptor effizient deren Aktivierung, ohne dabei mit der PDGF-Bindung zu interferieren¹⁵⁷. Als eine pharmakologisch aussichtsreiche Strategie zur Interferenz der Aktivierung des PDGF/PDGFR-Systems hat sich die Blockade der enzymatischen Aktivität der PDGF-Rezeptor-Tyrosinkinase etabliert¹²⁵. Tab. 4 gibt einen Überblick über derzeit verfügbare PDGFR-Kinase-Inhibitoren¹⁵⁸. Diese sind kleine, zellmembran-permeable Moleküle, die mit hoher Selektivität intrazellulär Tyrosinkinasen blockieren können^{159,160}. Grundlage der Hemmung ist dabei zumeist eine Interferenz mit dem ATP-Bindungszentrum der jeweiligen Kinase^{161,162}. Effiziente und in niedriger Konzentration funktionsfähige Blocker für die PDGF-Rezeptor-Tyrosinkinase sind AG-1295 und AG-1296. Diese Chinoxalin-Derivate hemmen wirkungsvoll die durch PDGF ausgelöste Proliferation von Fibroblasten, jedoch nicht deren Stimulation durch andere Wachstumsfaktoren¹⁶³. Für die Verbindung AG1295 konnte im Tiermodell gezeigt werden, dass bei lokaler Applikation AG1295 die Proliferation glatter Muskelzellen und die damit verbundene Bildung der interstitiellen Neointima sowie Restenose Prozesse abschwächt¹⁶⁴. Im Modell der interstitiellen Nierenfibrose durch eine einseitige Ureterligatur bei der Ratte zeigt die Applikation trotz drastischer und irreversibler Nierenschädigung eine Abschwächung der ausgebildeten Fibrose¹⁴⁸. Ein anderer Dual-Blocker, AG1872/PP1, hemmt sowohl die Tyrosinkinase-Aktivität des PDGF-Rezeptors als auch die Aktivität der wesentlich an der Generation des mitogenen Signals des Rezeptors beteiligten Zytoplasma-Tyrosinkinase p60c-Src¹⁶⁵.

Tab. 4: PDGF-Rezeptor-Tyrosinkinase Inhibitoren¹⁵⁸

PDGFR Kinase Inhibitoren	Jahr und Referenz
AG17 (Hydroxybenzyliden-Malononitril)	1991 ¹⁶⁶
AG370 (Indol)	1992 ¹⁶⁷
AG1295, AG1296 (Chinoxalin)	1994 ¹⁶³
Pyridinyl-Chinoline	1994 ¹⁶⁸
Phenylbenzimidazole	1998 ¹⁶⁹
RPR101511A (Chinoxalin)	1999 ¹⁷⁰
STI571/Glivec (Phenylaminopyrimidin)	2000 ^{171,172}
CT52923 (Chinoxalin)	2001 ¹⁷³
SU11248 (Indolinon)	2003 ¹⁷⁴
AGL 2033, AGL 2043 (Chinoxaline)	2003 ¹⁷⁵

2.7.1 Der Protein-Tyrosinkinase-Inhibitor STI571

Das im Jahr 2001 durch die FDA (Food and Drug Administration) der USA zugelassene Medikament STI571-(CGP57148B) der Firma Novartis (Schweiz) gilt durch die Hemmung der intrazellulären Signaltransduktion (STI) als neues kausales Therapieprinzip in der Onkologie. STI571 (Glivec), ein Phenylaminopyrimidin-Derivat, liegt als Mesylat vor und wirkt direkt inhibitorisch auf die Phosphorylierung des Signalproteins, indem es die ATP-Bindungsstelle der Tyrosinkinase Bcr-Abl *in vitro* und *in vivo* blockiert (Abb. 5). STI571 hemmt selektiv das Wachstum von CML-Zelllinien und Bcr-Abl-positiven Kolonien^{176,177}. Außerdem ist STI571 ein potenter Hemmstoff der Tyrosinkinasen Arg, PDGFR- α und - β und c-Kit^{172,178,179}. Ebenso vermag STI571 als effektiver Inhibitor des Makrophagen-Kolonie-Stimulations-Faktor Rezeptors c-fms zu wirken^{259,260}. STI571 inhibiert die Proliferation von Leukämiezellen von Patienten mit chronisch myeloischer Leukämie (CML) oder akuter lymphatischer Leukämie (ALL) und induziert deren Apoptose^{180,181}. In der CML wurden mit dem selektiv wirkenden Inhibitor STI571 rasche hämatologische und zytogenetische Remissionen bei geringen Nebenwirkungen wie leichte Übelkeit, Ödemen, Muskelkrämpfe oder Hautreizungen erreicht^{182,183}. Pharmakokinetische Studien über STI571 an gesunden Probanden und Patienten mit CML ergaben bei oraler Verabreichung des Medikamentes eine Bioverfügbarkeit von 98% bei einer Dosis von 100 bzw. 400 mg/d¹⁸⁴. Weitere Einsatzgebiete sind derzeit neben der CML, Hämoblastosen¹⁸⁵, gastrointestinale Stromatumoren (GIST)¹⁸⁶, Glioblastome¹⁷¹, Mastozysten¹⁸⁷ und Neoplastien, die auf einer Aktivierung der Tyrosinkinasen c-Kit und der PDGF-Rezeptoren beruhen¹⁸⁵. Ein weiteres mögliches therapeutisches Einsatzgebiet von STI571 könnte die Behandlung von Pankreaskarzinomen darstellen. Patienten mit einer Diagnose von Pankreas-Adenokarzinom haben derzeit eine niedrige Überlebensrate. Im Mausmodell konnte durch eine Behandlung mit STI571 die Inhibierung des Zellwachstums im Pankreas durch die Blockade der Tyrosinkinasen des PDGF-Rezeptors und c-Kit/SCFR gezeigt werden^{188,189}.

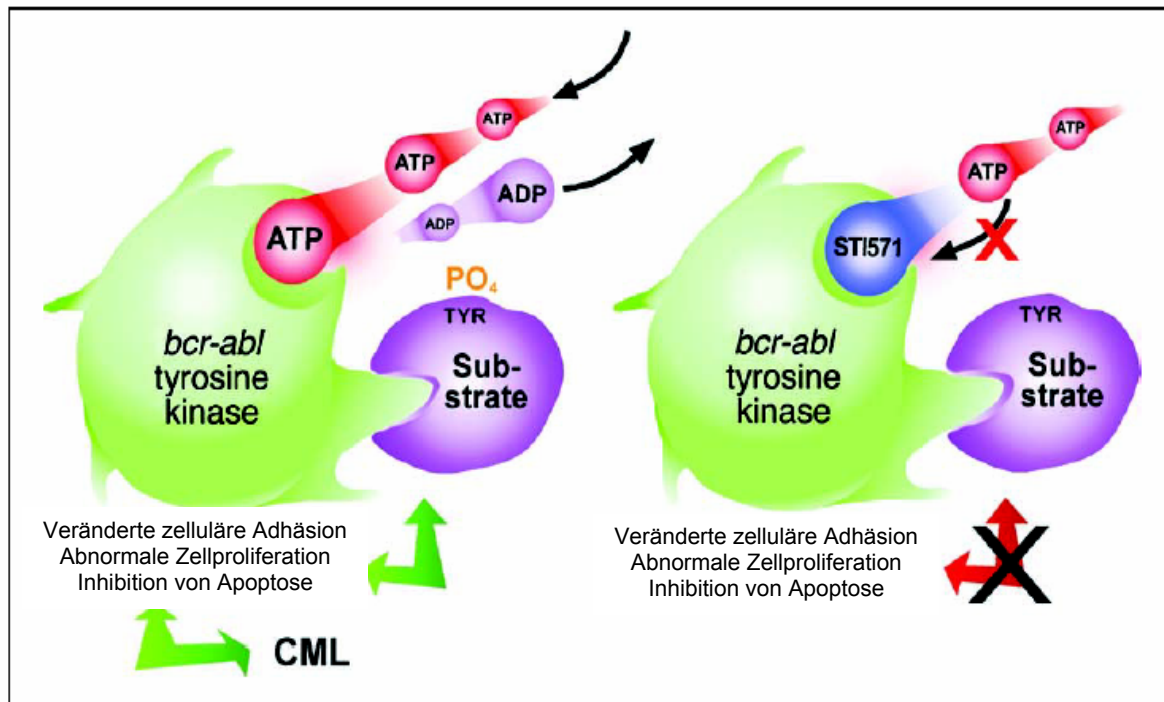


Abb. 5: Struktur und Wirkungsmechanismus des 2-Phenylaminopyrimidin-Derivats STI571. STI571 verdrängt ATP von der spezifischen Bindungsstelle an der Tyrosinkinase-Domäne von Bcr-Abl und verhindert somit die Phosphorylierung von Substraten^{190,191}.

2.7.2 Inhibierende Wirkung von STI571 auf verschiedene fibrotische Prozesse

Basierend auf der Fähigkeit von STI571 zur Hemmung einer begrenzten Anzahl von Tyrosinkinasen steigt die Möglichkeit für ein größeres Anwendungsspektrum in verschiedenen humanen Krankheitsbildern stetig an. Ebenso stützen neue Serien im Rahmen dieser Arbeit erhaltenden Daten die Hypothese, dass das PDGF/PDGFR-System an der Ausbildung von Fibrose in verschiedenen Organen beteiligt ist und eine Interferenz mit diesen Prozessen *in vivo* durch Applikation des Tyrosinkinase-Blockers STI571 möglich ist. Erste Studien am Mausmodell zeigten unter Verwendung des PDGF-Inhibitors STI571 die Beteiligung aller PDGF-Liganden und der PDGFR-Tyrosinkinase an der Fibrosierung der Lunge. STI571 zeigt entsprechende Wirksamkeit für die Behandlung der Lungenfibrose¹⁹². Zusätzlich konnte in diesem Krankheitsbild dokumentiert werden, dass profibrotische Zytokine wie TGF- β , ebenfalls an der Ausbildung von Lungenfibrose beteiligt sind. TGF- β stimulierte die c-Abl-Kinase-Aktivität unabhängig vom Smad2/3-Weg. Die Aktivierung der c-Abl-Kinase über TGF- β schien dabei nicht abhängig von der PDGFR-Tyrosin-Phosphorylierung oder -Expression zu sein. Eine Inhibition der c-Abl-Kinase-Aktivität durch STI571 vermindert eine TGF- β -vermittelte morphologische Veränderung in der Lunge⁹⁵. Ein ähnliches Bild konnte in der interstitiellen Nierenfibrose im Tiermodell beobachtet werden. Eine Behandlung mit STI571 vermochte nicht die Infiltration von Makrophagen in der Niere

zu verhindern, allerdings inhibiert STI571 den Anstieg von interstitiellen Fibroblasten und Myofibroblasten und die damit vermehrte Expression und Akkumulation vom Kollagen Typ III und IV sowie Fibronectin⁹⁶.

2.8 Zielstellung der Arbeit

Eine Infektion mit den humanpathogenen Coxsackievirus B3 gilt als der häufigste Auslöser einer viralen Herzmuskelentzündung, die in ihrer chronischen Phase zu einer dilatativen Kardiomyopathie mit progredienter Herzinsuffizienz führen kann. Pathogenetisch ist für die Dysfunktion des Herzens eine Myozytennekrose und die Fibrosierung des Myokards verantwortlich. Der Mechanismus, welcher der Fibrosierung des Myokards im chronischen Stadium der Erkrankung zugrunde liegt und die Faktoren, die bei einem Patienten nach einer CVB3-Infektion zum Entstehen einer DCM führen, sind bislang unzureichend geklärt.

In Analogie zu fibrotischen Prozessen in anderen Geweben kann angenommen werden, dass die Bindegewebsvermehrung durch lokal erhöhte Spiegel von Zytokinen und Wachstumsfaktoren ausgelöst wird. Faktoren der PDGF-Familie kommen als Mediatoren dieses Prozesses in Betracht, da sie sehr potente Mitogene für Fibroblasten darstellen, die im Rahmen einer Entzündung in das Gewebe einwandern.

Aufgrund der beschriebenen pathologischen Eigenschaften von PDGF-Isoformen und ihrer Rezeptoren im entzündeten Gewebe bestand die Zielstellung dieser Arbeit darin, die Rolle des PDGF/PDGFR-Systems, insbesondere PDGF-C, für die der Fibrosierung zugrunde liegenden Prozessen in einem etablierten Mausmodell der CVB3-induzierten Myokarditis an MHC Klasse II knockout Mäusen zu klären. Die Expression der PDGF- und PDGF-Rezeptor-Isoformen sollte analysiert und der Aktivitätszustand der PDGF-Rezeptoren „In Situ“ erfasst werden. Die erhaltenen Daten wurden mit denen von immunkompetenten C57BL/6 Wildtypmäusen, die einen identischen genetischen Hintergrund aufweisen (2H^b), verglichen. Die vorgesehenen histologischen, serologischen und molekularbiologischen Analysen sollten eine Charakterisierung der CVB3-induzierten, progressiv verlaufenden Myokardfibrose gestatten.

Die Prüfung der Hypothese, dass die Expression von Faktoren der PDGF-Familie und die Aktivierung des PDGFR-Systems kausal zur Fibrosierung der chronisch entzündeten Herzen von MHC Klasse II knockout Mäusen beiträgt, sollte durch Behandlungen von CVB3-induzierten Tieren mit dem Inhibitor der PDGF-Rezeptorsignaltransduktion STI571/Glivec, (Imatinib) erfolgen. Diese Untersuchungen sollten zugleich der Prüfung einer auf die Blockade der Signaltransduktion des PDGF-Rezeptors gerichteten Behandlung als ein mögliches neues therapeutisches Konzept für die chronische Myokarditis dienen.

3. Material

3.1 Cocksackievirus B3 (Nancy)

Für die Untersuchungen am Tiermodell wird die Virusvariante CVB3-München/Jena (Stamm Nancy) verwendet, die freundlicherweise von Prof. R. Kandolf (Institut für Pathologie der Universität Tübingen) zur Verfügung gestellt wurde⁵⁵. Das Virus wird in mykoplasmenfreien HeLa-Zellen zur Weitervermehrung passagiert und steht als Virusstock in 50 µl Portionen bei -70°C im Labor zur Verfügung. Der verwendete Virusstock enthält 8×10^7 pfu/ml.

3.2 Versuchstiere

Zur Untersuchung des PDGF/PDGFR-Systems in der CVB3-induzierten Myokarditis im Mausmodell werden zwei Mäusestämme eingesetzt, die einen genetisch identischen Hintergrund (H-2^b) besitzen. Im Tierversuch werden männliche, 8-12 Wochen alte Tiere verwendet. Die Tiere wurden bis zum Versuchsbeginn räumlich von infizierten Mäusen getrennt und erhalten Futter und Wasser ad libitum.

Die Versuche wurden bis 2002 im Infektionstierhaus des Institutes für Virologie unter konventionellen Haltungsbedingungen durchgeführt. Ab 2003 erfolgte die Haltung aller Tiere unter spezifisch-pathogenfreien Bedingungen (SPF) im Laborhaus des Institutes für Virologie und Antivirale Therapie des Universitätsklinikums.

Die dargestellten Ergebnisse der mRNA-Expression von Zytokinen und PDGF-Faktoren mittels semiquantitativer RT-PCR erfolgte an Myokardmaterial von C57BL/6 und MHC Klasse II knockout Mäusen, die aus der konventionellen, offenen Versuchstierhaltung stammten. Nach Einführung der SPF-Haltung wurde dieser Punkt erneut untersucht. Die erhaltenen Daten zeigten keine Änderungen und bestätigten die Ergebnisse der offenen Tierhaltung.

3.2.1 Immunkompetente C57BL/6 Maus

Alle verwendeten Versuchstiere wurden am Institut für Versuchstierkunde des Universitätsklinikums der Friedrich-Schiller Universität Jena unter SPF-Haltung gezüchtet.

3.2.2 Immundefekte MHC Klasse II (B6-Aa⁰/Aa⁰) knockout Maus

Die MHC Klasse II (B6-Aa⁰/Aa⁰) knockout Maus wurde freundlicherweise von H. Blüthmann (Hoffmann La Roche, Basel) zur Verfügung gestellt⁸³. Die Nachzucht erfolgte bis 2002 im Infektionstierhaus des Institutes für Virologie, räumlich getrennt von infizierten Mäusen. Seit 2003 findet die Zucht und Haltung der Mäuse unter SPF-Bedingungen im Laborhaus des Institutes für Virologie und Antivirale Therapie in eizelbelüfteten-Käfigen (IVC) statt. Die

Haltung der Mäuse erfolgt wie oben beschrieben und die Handhabung entspricht denen der C57BL/6 Mäuse.

3.3 Oligonukleotid-Primer

Die angegebenen Primer sind, sofern nicht anders vermerkt, käuflich erworben oder im Institut für Virologie und Antivirale Therapie Jena von Dr. E. Birsch-Hirschfeld synthetisiert und in 5' zu 3' Richtung angegeben (S': sense; AS': antisense). Laut Hersteller amplifizieren die Primerpaare für IL-2, IL-1 α , IL-6 keine genomische DNA oder das Amplifikationsprodukt besitzt nicht die angegebene Basenpaargröße (IFN- γ , IL-10, TNF- α , IFN- β). Für die PCR mit Primeramplifikation der PDGF-Familie ist eine PCR mit genomischer DNA durchgeführt worden. Die erhaltenen Produkte weisen nicht die angegebene Größe auf, damit kann eine Vervielfältigung von genomischer DNA ausgeschlossen werden (Tab. 7 im Anhang).

3.4 Plasmid

Das pBluescript II KS(+) Plasmid, 2961 bp, (Abb. 21 im Anhang) der Firma Stratagene (STRATAGENE, La Jolla, USA) ist für die Konstruktion des Kontrollfragmentes der semiquantitativen PCR sowie für die Herstellung der spezifischen RNA-Sonden für die In Situ-Hybridisierung verwendet wurden.

Die MSC (multiple cloning site), 657-759 bp, wird durch die T7 (5'-GTA ATAVCGA CTC ACT ATA GGG C-3') und T3 (5'-GTA ATAVCGA CTC ACT ATA GGG C-3') RNA-Polymerase-Promotoren flankiert, was eine *in vitro* RNA-Synthese gestattet. Des Weiteren besitzt das Plasmid ein Ampicillin-Resistenz-Gen (1975-2832 bp), ein lacZ-Gen, das durch eine α -Komplementation eine Blau/Weiß-Farbselektion der Plasmide ermöglicht. Die Induktion des lac-Promotors (816-938 bp) ermöglicht eine Protein-Fusions-Expression mit dem β -Galactosidase Gen. Das in Abwesenheit von Helferphagen benutzte Co/E1 (1032-1972 bp) stellt das origin of replication dar.

3.5 Chemikalien

Name	Hersteller
10% AP (Ammoniumpersulfat)	SIGMA, Deisenhofen
100 bp Ladder	MBI FERMENTAS, GmbH St. Leon-Rot
10x cloned Pfu DNA-Polymerase-Puffer	ROCHE, Mannheim
10x PCR-Synthesepuffer	HYBRID AGS, Heidelberg
20x SSC	SERVA, Heidelberg
2-Mercaptoethanol (Thioethylenglykol)	FERAK, Berlin
5x First Strand Puffer	LIFE TECHNOLOGIES, Praisley, Schottland
6x Loading Dye Solution (Ladepuffer)	MBI FERMENTAS, GmbH St. Leon-Rot
Aceton	J.T. BAKER, Deventer, Holland
Acetonitril	CARL Roth, Karlsruhe
Acrylamide/Bisacrylamide (AB)	CARL ROTH, Karlsruhe
Agarose	LIFE TECHNOLOGIES, Praisley, Schottland
Aquatex	MERCK, Darmstadt
Äther (zur Narkose)	MALLINCKRODT BARKER, Gieselheim
ATP (Adenosintriphosphat)	SIGMA, Deisenhofen
Avidin	FLUKA AG, Neu-Ulm
Bench Mark	GIBCO BRL
Blockierungsreagenz	MERCK, Darmstadt
Borsäure	SERVA, Heidelberg
Bromphenolblau	SIGMA, Deisenhofen
BSA (Rinder (bovine) Serumalbumin)	SIGMA, Deisenhofen
Chloroform/Isoamyl-Alkohol (24:1)	SIGMA, Deisenhofen
Cryomatrix (Einbettmedium für Gefrierschnitte)	SHANDON, Frankfurt am Main
Dextransulfat	SERVA, Heidelberg
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	FLUKA/ Chemika, Buchs
DIG-RNA-Labeling-Mix	ROCHE, Mannheim
DMEM	SIGMA, Deisenhofen
dNTPs (Desoxyribonukleosidtriphosphate)	PROMEGA, Madison, USA
dNTPs (10xDIG-RNA-Labeling-Mix)	ROCHE, Mannheim
DTT (1,4-Dithioeritol)	LIFE TECHNOLOGIES, Praisley, Schottland
ECL-Western Lightning	NEN LIFE SCIENCE, Bosten, USA
EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure)	SERVA, Heidelberg
EGTA	SIGMA, Deisenhofen
Eosin	MERCK, Darmstadt

Ethanol	MERCK, Darmstadt
Ethanol (vergällt)	EURO-ALKOHOL, Nordhausen
Ethidiumbromid	SERVA, Heidelberg
FCS (fetal calf serum, fötales Kälberserum)	PAA, Linz, Österreich
Formaldehyd	ROTH, Karlsruhe
Formalin	SIGMA, Deisenhofen
Formamid	SERVA, Heidelberg
Glas-Mikrofilter-Papier (Porengröße: 22µm)	WHATMAN, Maidstone, England
Glycin	SIGMA, Deisenhofen
Glyzerin	SIGMA, Deisenhofen
Guanidinisothiocyanat	SIGMA, Deisenhofen
H ₂ O ₂ (Wasserstoffperoxid)	MERCK, Darmstadt
Hämatoxylin	FLUKA AG, Neu-Ulm
HCl (Salzsäure)	SERVA, Heidelberg
HEPES (N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-Ethansulfonsäure)	SERVE, Heidelberg
Heringssperma-DNA	INVITROGEN, Karlsruhe
Hypermount (Eindeckelmedium)	SHANDON, Frankfurt am Main
Ionenaustauscher	GRÜNBECK GENO-Sep, Wien, Österreich
Isopropanol absolut (2 Propanol)	CARL ROTH GmbH + Co, Karlsruhe
KCl (Kaliumchlorid)	LABORCHEMIE, Apolda
KH ₂ PO ₄ (Kaliumhydrogenphosphat)	MERCK, Darmstadt
LB-Medium	MERCK, Darmstadt
Ligationspuffer	SIGMA, Deisenhofen
Lithiumchlorid	CARL ROTH, Karlsruhe
Magermilchpulver	NESTLE, Frankfurt a. M.
Maleinsäure	SERVA, Heidelberg
Mausserum	DIANOVA, Hamburg
MEM/E	SIGMA, Deisenhofen
Methylbenzoat	MERCK, Darmstadt
MgCl ₂ (Magnesiumchlorid)	HYBRID AGS, Heidelberg
MnCl ₂ (Manganchlorid)	CARL ROTH, Karlsruhe
Na ₂ HPO ₄ * 12H ₂ O (Natriumhydrogenphosphat)	SIGMA, Deisenhofen
Na-Acetat	MERCK, Darmstadt
NaCl (Natriumchlorid)	SERVA, Heidelberg
NaHPO ₄ (Natriumphosphat)	LABORCHEMIE, Apolda
Na-N-Laurylsarcosine	SIGMA, Deisenhofen

NaOH (Natriumhydroxid)	SIGMA, Deisenhofen
Natriumcitrat-Dihydrat	MERCK, Darmstadt
Natriumdesoxycholsäure	FLUKA AG, Neu-Ulm
Natriumphosphat	FLUKA AG, Neu-Ulm
NBT/BCIP-Stock Lösung	ROCHE, Mannheim
NKS (newborn calf serum)	PAA, Linz, Österreich
Nylon-Membran	MILLIPORE, Bedford
Oligo-d(T)	INSTITUT FÜR VIROLOGIE, Jena
Paraffin	SHANDON, Frankfurt am Main
PCR-DIG-Probe-Synthesis-Kit	ROCHE, Mannheim
Penicillin	SIGMA, Deisenhofen
Peroxidase Substrat Kit (AEC) (Chromogenes Substrat)	LINARIS; Wertheim-Bettingen
Phenol	SIGMA, Deisenhofen
Platelet-derived growth factor (PDGF)	TEBU, Frankfurt a. M.
Polyvinylpyrroliden	SERVA, Heidelberg
Prestained Protein Marker	BIO LABS, New England
Protease VIII	SIGMA, Deisenhofen
Protein-A-Sepharose	AMERSHAM BIOSCIENCES, Uppsala Schweden
PVDF-Membran	MILLIPORE, Bedford
RNase-Inhibitor; 40 U/µl	ROCHE, Mannheim
SDS (Dodecylsulfat; Na-Salz)	SERVA, Heidelberg
Siriusrot	ALDRICH CHEMICAL COMPANY, Milwaukee, USA
SPK (Streptavidin-Peroxidase-Komplex)	DIANOVA, Hamburg
Streptomycin	SIGMA, Deisenhofen
TEMEM (N',N',N',N'-Tetramethylethylenediamine)	SERVE, Heidelberg
Transkriptionspuffer für in vitro Transkription	ROCHE, Mannheim
TRIS (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan)	SERVA, Heidelberg
TritonX X100	FERAK, Berlin
TWEEN 20	SERVA, Heidelberg
Weizenkeim-Lecitin-Agarose	AMERSHAM PHARMACIA,

3.6 Enzyme

Name	Hersteller	Enzymtyp	Aktivität
Superscript™ II-RT	LIFE TECHNOLOGIES, Paisley, Schottland	Reverse Transkriptase (RNA-abhängige-DNA-Polymerase)	200 U/μl
TAQ-DNA-POLYMERASE	ANGEWANDTE GENTECHNOLOGY SYSTEM GmbH, Heidelberg	DNA-abhängige-DNA-Polymerase	5,0 U/μl
PfuTurbo-Hotstart DNA-Polymerase	STRATAGENE, La Jolla, CA, USA	DNA-abhängige-DNA-Polymerase	2,5 U/μl
T3-RNA-Polymerase	ROCHE, Mannheim	DNA-abhängige-RNA-Polymerase	20 U/μl
T7-RNA-Polymerase	ROCHE, Mannheim	DNA-abhängige-RNA-Polymerase	20 U/μl
BssH II	SIGMA, Deisenhofen	Restriktions-Endonuklease	0,3 U/μg
BamH I	SIGMA; Deisenhofen	Restriktions-Endonuklease	0,5 U/μg
EcoR V	MERCK, Darmstadt	Restriktions-Endonuklease	0,2 U/μg
T4-Ligase	ROCHE, Mannheim	DNA-Ligase	200 U/μl

3.7 Antikörper

Primärantikörper

AK-Klon	Isotyp / Antigen-Spezifität	Firma / Referenz
I-20	Ziege anti-PDGF-A (polyclonal)	SANTA CRUZ, USA
H-55	Kaninchen anti-PDGF-B (polyclonal)	SANTA CRUZ, USA
SP1	Kaninchen anti-PDGF-C (polyclonal)	¹⁹³ SANTA CRUZ, USA
951	Kaninchen anti-PDGFR-α	SANTA CRUZ, USA
958	Kaninchen anti-PDGFR-β	SANTA CRUZ, USA
Ser473	Kaninchen anti-Phospho-Akt (polyclonal)	CELL SIGNALING, USA
4GL 10	Maus anti-Phosphotyrosin	UPSTATE, USA
H-10	Maus anti-Vinculin	SANTA Cruz, USA
Sc-2027	Normales Kaninchen IgG (Isotypkontrolle)	SANTA CRUZ, USA

Sekundärantikörper

Sekundärantikörper	Isotyp / Antigen-Spezifität	Firma / Referenz
BIOTIN-konjugiert-polyclonal	Ziege anti-Kaninchen IgG	BD PHARMINGEN, Heidelberg
BIOTIN-SP-konjugiert-affinitätsgereinigt-F(ab') ₂ -Fragment	Kaninchen anti-Ziege IgG (H+L)	DIANOVA, Hamburg
Anti-Digoxigenin-AP, Fab-Fragment	DIG anti-Schaf IgG	ROCHE, Mannheim
HRP-konjugiert-affinitätsgereinigt	Ziege anti-Maus IgG	SANTA CRUZ, USA

3.8 Inhibitoren

Inhibitoren	Bezugsquelle
Aprotinin	BAYER (Trasylol®), Leverkusen
Leupeptin	SIGMA, Deisenhofen
PMSF (Phenylmethylsulfonylflurid)	APPLICHEN, Darmstadt
Natriumorthovanadat	SIGMA, Deisenhofen

3.9 Geräte

Geräte	Hersteller
Absauggerät Vakuboy Bottle Set	INTEGRA, BIOSCIENCES, Fernwald
Bildverarbeitungsprogramm, Axio-Vision Version 3.1.	CARL-ZEISS-VISION GmbH, Jena
Brutschrank (mit 5% CO ₂ -Begasung)	HERAEUS, Hanau
diverse Eppendorfpipetten	EPPENDORF, Köln
elektronische Präzisionswaage	SARTORIUS, Göttingen
Elektrophoresekammer HYBAID AGB	THERMO ELECTRON GmbH, Karlsruhe
Extinktionsmeßgerät (DYNATECH MR 5000)	DIAS, Guernsey, Island
Fotokamera CONTAX 167 MT	YASHICA, Hamburg
Gewebeeinbettautomat Citadel 1000	SHANDON, Frankfurt am Main
Herolab E.A.S.Y.	MOLEKULARE TRENNTÉCHNIKSYSTEME, Wiesbaden
Kryotom AS 620 E	SHANDON, Frankfurt a. Main
Mikroskop Axioskop 2	CARL-ZEISS, Jena
Paraffinausgießsystem Histocenter 2	SHANDON, Frankfurt am Main
PCR-Cycler	BIOZYM, Oldendorf
Schlittenmikrotom Jung SM 2000R	LEICA, Bensheim
Schüttler GFL 3006	GFL, Burgwedel
SDS-Gelelektrophorese-Kammer	BIO RAD, München
Semi-Dry-Transfer-Kammer	BIO RAD, München
Taumler REAX 3	HEIDOLPH, Kehlheim
Transferpipette	BRAND, Wertheim
Ultra-Turrax T 25	JANKE + KUNKEL, IKA Labortechnik
UV-Visible Recording Spektrophotometer	SHIMADZU, Kyoto, Japan
Vakuumpumpe / Vakuumexikator	INOTECH, Dottikon, Schweiz
Vortexgerät GENIE	SCIENTIFIC INDUSTRIES Inc., Springfield, Massachusetts, USA
Werkbank (Laminarbox)	KENDRO/HERAEUS, Hanau

3.10 Puffer und Stammlösungen

Lösungen	Zusammensetzung
Zellen für Testassays	
HeLa-Zellen (humane Cervixcarcinom-Zellen); CCL-2, ATCC, Rockville, USA	
SWISS 3T3 Fibroblasten (humane Fibroblasten); ATCC, Manassas, USA	
M15[pREP4] (kompetenter <i>Escherichia coli</i> - Stamm)	
Allgemeine Reagenzien	
PBS	0,11 M NaCl; 2,7 mM KCl; 6,5 mM Na ₂ HPO ₄ *12H ₂ O; 1,5 mM KH ₂ PO ₄ ; pH 7,2
<i>Reagenzien für die RNA-Isolierung</i>	<i>Alle Lösungen sind unter der Laminarbox hergestellt und abgefüllt.</i>
Inkubationslösung (Lösung I)	4,0 M Guanidinisothiocyanat in 50 ml Aqua dest. lösen; 17 mM Na-N-Laurylsarcosin; 50 mM Na-Citrat; pH 7,0 (mit 1 M NaOH); filtrieren mit sterilen Glas-Mikro-Filterpapier (Porengröße: 22µm); vor Versuchsbeginn 14 ml Lösung mit 114 µl 2-Mercaptoethanol versetzen
Lösung II	Chloroform-Phenol-Lösung: 10 ml Phenol; 1 ml Na-Acetat; 2 ml Chloroform
Lösung III	Isopropanol ^{absolut}
DEPC-H ₂ O	1000 ml Aqua dest.; 1 ml Diethylpyrocarbonat; 24 h rühren; 2x autoklavieren
Reagenzien für Reverse Transkription	2,5 µl Oligo-d(T); 10 µl 5x First-Strand Puffer; 2,5 µl 0,1mM DTT; 2,5 µl 10mM dNTP; 2,5 µl Superscript™ II RT
Reagenzien für RT-PCR-Reaktion	siehe Tab. 8 (im Anhang)
<i>Reagenzien für Gelelektrophorese</i>	
5x TBE-Puffer	0,45 M Tris; 0,45 M Borsäure; 12,5 mM EDTA; 1000 ml Aqua dest. auffüllen; pH 8,0
Ethidiumbromid	Stammlösung: 5 mg/ml Gebrauchslösung: 1 µg/ml pro 1,5% Agarosegel: 12 µl Ethidiumbromid (120ml 1x TBE-Puffer + 1,8 g Agarose)
<i>Reagenzien für die Herstellung der VP1-DNA Sonde</i>	<i>Die Herstellung der VP1-DNA Sonde erfolgt unter Verwendung der Lösungen und Reagenzien des PCR-Sonden-Synthese-Kit der Firma ROCHE.</i>
<i>Reagenzien für die Herstellung der PDGF-C-RNA Sonde</i>	
Herstellung des blind-end-PCR-Fragmentes	4,0 ml Aqua dest.; 5,0 µl 10x Pfu DNA-Polymerase-Puffer; 1,0 µl dNTP; 1,0 µl

	PDGF-C AS`S`-Primer; 1,0 µl verdünnte (1:10) PDGF-C cDNA; 0,75 µl Pfu-DNA-Polymerase (2,5 U/µl)
pBluescript-Vektor	1 µl DNA (3 µg/mg PBS); 3 µl 10 µl Puffer; 0,3 µl 100xBSA; 1 µl Enzym Eco RV; 25 µl Aqua dest.
Ligationsansatz	1 µl 10x Ligationspuffer; 0,25 µl 10 mM ATP; 1 µl 50% PEG 6000; 1 µl pBS Vektor; 2 µl PCR-Fragment (625 bp); 1,0 µl T4-Ligase; 3,5 µl Aqua dest.
Transformation	80 µl kompetente Zellen (M15[pREP4]); 20 µl 5x KMC ; 5 µl Ligationsansatz
Restriktionsverdau	4 µl DNA; 2 µl 10x Puffer; 1 µl BAM HI; 13 µl Aqua dest.
partieller BssH II-Verdau	2 µl DNA; 2 µl 10x Puffer; 1,5 µl BssH II; 15 µl Aqua dest.
In vitro Transkription	13 µl cDNA; 2 µl 10xTranskriptionspuffer; 2 µl dNTPs; Rnase-Inhibitor (40 U/ml); 2 µl T3- bzw. T7-Polymerase (20 U/µl)
<i>Puffer und Reagenzien der In Situ-Hybridisierung</i>	
Puffer 1	100 mM Maleinsäure; 150 mM NaCl in 800 ml Aqua dest. lösen; pH 7,5 (konz. NaOH); mit Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen
Blockierungspuffer-Stammlösung	10 g Blockierungsreagenz in 100 ml Puffer 1 lösen, Lagerung bei -20°C
Puffer 2	Blockierungspuffer-Stammlösung 1:10 in Puffer 1 verdünnen
Puffer 3	100 mM Tris; 100 mM NaCl; in Aqua dest. lösen; 9,5 (1 M HCL); 50 mM MgCl ₂ ; auf 1000 ml Aqua dest. auffüllen
Hybridisierungspuffer	1 g Dextransulfat in 5 ml 2x SET-Puffer lösen; 5 ml deioisiertes Formamid (2,5 g Ionenaustauscher + 25 ml Formamid); 200 µl Polyvinylpyrrolidon (50 mg/ml); 50 µl 20% SDS; durch 45 µm Filter filtrieren; 500 µl Heringssperma-DNA (10 mg/ml)
2-fach SET-Puffer	50 mM Tris; 300 mM NaCl; 2 mM EDTA in 1000 ml Aqua dest. lösen; pH 7,4 (HCL)
Formamidersatzpuffer	80 ml 5x SSC; 80 µl 10% N-Laurylsacrosin; 16 µl 10% SDS
20x SSC	3 M NaCl; 0,3 M Natriumcitrat in 250 ml Aqua dest. lösen; pH 7,0; auf 1000 ml Aqua dest. auffüllen
Protease VIII	Verdünnung; 500 µg/ml; 1 mg Protease VIII in 2 ml PBS (komplett)
<i>Waschlösungen der PDGF-C Sonde</i>	
Formamidwaschpuffer	60% Formamid in 0,2x SSC
Waschpuffer	100 mM Tris; 150 mM NaCl; pH 7,5; auf 1000ml mit Aqua dest. auffüllen
Detektionspuffer	100 mM Tris; 50 mM MgCl ₂ ; pH 9,5; auf 1000 ml mit Aqua dest. auffüllen
<i>Puffer für PDGF/PDGFR</i>	

<i>Aktivitätsnachweis im Myokardgewebe</i>	
Tris-HCL Lysispuffer	0,5 M Tris, pH 7,5; 0,1 M NaCl; 0,1 mM EDTA; 200 KIE/ml Aprotinin; 4 mM PMSF
Triton-Lysispuffer	50 mM HEPES, pH 7,5; 150 mM NaCl; 1,5 mM MgCl ₂ ; 1 mM EDTA; 1% TritonX 100; 1% Natriumdeoxycholsäure; 0,1% SDS; 10% Glyzerin; 10 mM Natriumpyrophosphat; 1 mM DTT; auf 500 ml Aqua dest. auffüllen, aliquotieren und bei -20°C lagern; vor der Benutzung die Inhibitoren frisch dazugeben: 1 µg/ml Leupeptin; 1 mM PMSF; 200 KIE/ml Aprotinin; 1 mM Natriumorthovanadat (vor Benutzung 5 min bei 95°C denaturieren)
5x TBS / TWEEN 20 Waschpuffer	10 mM Tris; pH Wert 7,4; TWEEN 20
HNTG-Puffer	20 mM HEPES; 150 mM NaCl ₂ ; 0,1% TritonX 100; 10% Glyzerin
<i>Puffer und Reagenzien für den SDS-PAGE</i>	
Sammelgelpuffer für SDS-Gel	0,5 M Tris; pH 6,8; auf 500 ml mit Aqua dest. auffüllen
Trenngelpuffer für SDS-Gel	2,0 M Tris; pH 8,8; auf 500 ml mit Aqua dest. auffüllen
Laufpuffer für SDS-Gelelektrophorese (10fach konzentriert)	384 mM Glycin; 50 mM Tris, pH 8,7; 0,1% SDS; auf 1000 ml Aqua dest. auffüllen
6x Probenpuffer (6xA)	30% β-Mercaptoethanol; 40% Glyzerin; 7% SDS (20%iges), Bromphenolblau
Ammoniumpersulfat (10%ig)	1 g Ammoniumpersulfat in 10 ml Aqua dest. lösen, aliquotieren, bei -20°C lagern
Transferpuffer für semi-dry Blot	39 mM Glycin; 48 mM Tris; pH 9,0; 20% Methanol; 0,037% SDS; auf 1000 ml mit Aqua dest. auffüllen

4. Methoden

4.1 Infektion der Versuchstiere

Adulte 8-12 Wochen alte, männliche C57BL/6 und MHC Klasse II knockout Mäuse werden durch eine Injektion von 1×10^4 pfu CVB3-Mü/J (Stamm Nancy) in 0,5 ml serumfreien MEM/E im Bereich des Unterbauches mit dem Virus infiziert. Je nach Fragestellung und Untersuchungsmethode werden an den Tagen 7, 21 und 56 nach CVB3-Infektion, Tiere von beiden Stämmen unter Äthernarkose abgetötet. Diese Tage repräsentieren verschiedene Zeitpunkte der Infektion; akute Phase der Infektion: 7. Tag p. i. sowie zwei späte Zeitpunkte: 21. Tag p. i., der bereits in die chronische Phase der Infektion reicht und Tag 56 p. i., der einen Progress des chronischen Krankheitsbildes geben soll. Eine Kontrollgruppe von je 3 Tieren jedes Mausstammes erhält je nach Versuchsplanung keine Infektion bzw. anstelle des Virus eine Infektion mit MEM/E (Scheininfektion). Diese Tiere werden getrennt von den infizierten Mäusen gehalten und parallel zu diesen abgetötet. In die Untersuchungen der CVB3-induzierten Myokarditis sind alle Tiere beider Mäusestämme eingegangen, die einen positiven Nachweis einer stattgefundenen Virusinfektion aufwiesen²⁵⁹.

4.2 Sektion und Organentnahme

Die Tiere werden mit Äther betäubt und abgetötet. Nach Eröffnen des Bauchraumes und Durchtrennung der Aorta erfolgt die Blutentnahme. Die Organe Herz, Pankreas, Milz, Leber und Lunge werden entnommen und im Ganzen gewogen. Je nach Fragestellung werden diese geteilt und für die entsprechenden Untersuchungsmethoden vorbereitet. Die Organhälften (Herz und Pankreas) für die histologische Bewertung werden in 4%-igem Formalin fixiert. Die Organe (Herz, Pankreas) für die TCID₅₀-Bestimmung werden gewogen und für 2 h in 0,9%-iger Natriumchloridlösung mit Penicillin und Streptomycin eingelegt, anschließend wird die Lösung abgesaugt und die Organteile bei -20°C tiefgefroren. Die Organteile (Herz), die für biochemische Untersuchungen vorgesehen sind, werden in PBS gewaschen, gewogen und in sterilen Gefrierhörchen mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Aufarbeitung bei -80°C gelagert. Die Myokardteile zur immunhistochemischen Untersuchung werden mit Cryomatrix (Einbettmedium für Gefrierschnitte) benetzt und dann in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Myokardhälften, die für die RNA-Isolierung vorgesehen sind, werden ebenfalls in sterilen Gefrierhörchen mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

4.3 Histologie

Die in Formalin fixierten Organe (Herz, Pankreas) werden mit dem Gewebeeinbettautomat in einer ansteigenden Alkoholreihe entwässert und in Paraffin eingebettet. Am Schlittenmikrotom wird das eingebettete Organ in 6 µm dünne Scheiben geschnitten. Die Schnitte gleiten in ein Wasserbad, woraus sie sich faltenlos auf die Objektträger auftragen lassen. Die Präparate werden bei 37°C über Nacht getrocknet und durch eine absteigende Alkoholreihe entparaffiniert, mit Hämatoxylin/Eosin oder Siriusrot¹⁹⁴ gefärbt. Die Auswertung der mit Hypermount eingedeckelten Präparate erfolgt lichtmikroskopisch am Axioskop 2 der Firma Carl Zeiss Jena, anhand von im Labor festgelegten Kriterien (Tab. 10 im Anhang). Die Bilder wurden mit der Kamera CONTAX 167 MT aufgenommen. Das Bildverarbeitungsprogramm, Axio-Vision Version 3.1. von Carl Zeiss Jena, ermöglicht eine computergestützte Bilddokumentation und ist für die Anfertigung des Bildmaterials in der vorliegenden Arbeit verwendet worden.

Um qualitative Unterschiede differenzierter erfassen zu können, wird die Siriusrot-Färbung mit einem Bildanalyseprogramm der Firma Leica ausgewertet. Dazu wird das histologische Präparat mit einer Bildanalysekamera in den Farben Rot (Bindegewebe), Grün (Hohlräume, Einbettmaterial) und Blau (Muskelzellen) aufgenommen und mit der Software QWin Standard der Firma Leica analysiert. Der ermittelte Wert wird in Prozent (%) angegeben.

4.4 TCID₅₀-Test (Tissue culture infection dose)

Die zu untersuchenden Organe (Herz) werden steril mit Seesand in Mörsern mit Zerreibungsmedium (MEM/E + 100 I.E. Penicillin und 0,1% mg/ml Streptomycin + 2% NKS) zerrieben, so dass eine 2%-ige (w/v) Lösung entsteht. Bezugswert dieser Lösung ist das Gewicht der einzelnen Organteile. Die hergestellte Suspension verbleibt 2 h bei Raumtemperatur und wird anschließend tiefgefroren (-20°C). Um möglichst alle Zellen aus dem Gewebe der Organe zu zerstören, werden die Proben insgesamt 3x aufgetaut und wieder eingefroren. Für die Durchführung des Testes werden auf eine 96-Loch-Mikrotiterplatte HeLa-Zellen (100 µl pro Loch, ca. 1,7x 10⁵ Zellen pro ml) ausgesät und für 2 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. In vier Parallelen wird pro Loch 50 µl einer Verdünnung der Organsuspension auf die HeLa-Zellen gegeben. Die Organsuspension wird in Verdünnungsschritten von 10⁻¹ bis 10⁻⁷ (in Abhängigkeit vom Tag der Infektion und dem zu untersuchenden Organ) im Medium verdünnt. Pro Mikrotiterplatte wird eine Zellkontrolle in 4 Parallelen mitgeführt, wobei anstelle der Organsuspension Medium auf die HeLa-Zellen aufgetragen wird. Die Inkubation der Platten erfolgt in einer feuchten Kammer bei 37°C und 5% CO₂ für 5 Tage. Jedes einzelne Loch der Mikrotiterplatte wird am 5. Tag der Inkubation lichtmikroskopisch auf das Vorhandensein zytopathischer Effekte ausgewertet. Die

Berechnung des Virustiters erfolgt nach der Methode von Reed und Muench¹⁹⁵ und wird als Ig TCID₅₀/100 mg Gewebe angegeben. Die Nachweisgrenze des Testes liegt bei 2,33.

4.5 RNA-Präparation

Die Extraktion zellulärer RNA erfolgt mit Lösungen, deren Zusammensetzungen dem Arbeitsprotokoll „Isolation Roti®-Quick-Kit“ der Firma Roth, Karlsruhe, zur Isolierung von RNA aus Zellen und Gewebe entspricht. Alle verwendeten Lösungen werden mit DEPC-Wasser angesetzt, die verwendeten Pipetten sind RNase frei und alle Inkubations- und Arbeitsschritte werden bei 4°C auf Eis durchgeführt. Die bis zur Aufarbeitung bei -80°C gelagerten Myokardproben werden mit 1 ml Inkubationslösung (*Lösung I*) versetzt und im Ultra-Turrax auf Eis homogenisiert. Die genomische DNA wird im Anschluss mit Hilfe einer 1 ml Spritze mit einer Kanüle geschert. Nach Zugabe von 1,3 ml Lösung eines Chloroform-Phenol-Gemisches (*Lösung II*) wird die Suspension 30 min auf Eis inkubiert. Während dieser Zeit bilden sich zwei Phasen, die durch 25 minütiges Zentrifugieren bei 4°C und 10000 U/min noch exakter getrennt werden. Die obere/wässrige Phase, welche die RNA enthält, wird abgenommen und ein gleiches Volumen Isopropanol_{absolut} (*Lösung III*) hinzu gegeben. Zur Ausfällung der RNA aus der Lösung wird der Ansatz 2-4 h bei -20°C inkubiert. Der Überstand wird nach erneutem Zentrifugieren für 35 min bei 1400 U/min und 4°C abgenommen. Das RNA-Pellet wird in 600 µl Lösung I gelöst und nochmals mit 600 µl Lösung III versehen. Zur kompletten Ausfällung der RNA erfolgt eine Inkubation über Nacht bei -20°C. Die RNA wird am Folgetag bei 4°C und 13000 U/min für 30 min sedimentiert, das Pellet in 500 µl eiskaltem 70%igem Ethanol gewaschen und anschließend bei 12000 U/min für 15 min bei 4°C zentrifugiert. Der angegebene Waschschrift wird wiederholt und anschließend das gewaschene Pellet im Vakuumexikator für 15 min getrocknet. Das RNA-Pellet wird in 30 µl DEPC-H₂O aufgenommen, gelöst und 30 min auf Eis inkubiert. Zur Konzentrationsbestimmung der extrahierten RNA wird die optische Dichte bei 260 nm am UV-Spektrophotometer gemessen. Dazu werden 5 µl der RNA mit DEPC-H₂O verdünnt (Verdünnung 1:200). Die Konzentration wird berechnet nach $c \text{ (}\mu\text{g/ml)} = \text{OD}_{260} \times \text{Verdünnung} \times 40$. Der Reinheitsgrad der isolierten RNA ermittelt sich aus dem Quotienten von 280 nm und 260 nm. Eine anschließende Untersuchung auf mögliche Degradationen der RNA ist mittels eines RNA-Geles stichprobenhaft durchgeführt worden. Beim Vorhandensein von intakter RNA sind die Banden 18S und 26S rRNA deutlich zu erkennen.

4.6 Reverse Transkription

Mit Hilfe retroviraler reverser Transkriptase kann RNA in cDNA umgeschrieben werden. Dafür wird ein oligo-d(T)-Primer verwendet, der die mRNA der Zelle sowie die virale RNA auf Grund ihrer Poly-A-Sequenz am 3' Ende umschreiben kann. Zur reversen Transkription werden 5 µg RNA der entsprechenden Probe mit DEPC-H₂O auf 25 µl aufgefüllt und 2,5 µl oligo-d(T)-Primer (0,5 µg/µl Endkonzentration: 82 µM) zugegeben. Bei anschließender 10-minütiger Inkubation bei 70°C erfolgt die Denaturierung. Für diesen Ansatz werden folgende Lösungen benötigt: 10 µl 5x First Strand Puffer, 5 µl 100 mM DTT, 5 µl 10 mM dNTP und 2,5 µl Superscript™ II RT (200 U/µl). Im Anschluss erfolgen im Biozym-DNA-Cycler das Primer-Annealing für 10 min bei Raumtemperatur, der reverse Transkriptionsschritt bei 42°C für 50 min und eine Denaturierung von 5 min bei 90°C. Die gewonnene cDNA wird anschließend auf Eis gestellt und kann für die Polymerase-Kettenreaktion verwendet werden. Die Lagerung der cDNA erfolgt bei -20°C.

4.7 Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Die Methode dient zur Amplifizierung von DNA-Molekülen. Durch Verwendung einer thermostabilen DNA-Polymerase (Taq-Polymerase) wird die zyklische Wiederholung der benötigten Reaktionsschritte (Denaturierung, Primer-Annealing, DNA-Polymerisation) ermöglicht. Die Parameter der einzelnen Schritte (Zeit, Temperatur) sind abhängig vom Template, von der Länge des zu amplifizierenden Abschnittes und von der Länge der verwendeten Primer ab. Zur Amplifizierung spezifischer cDNA-Sequenzen wird die PCR-Mischung auf Eis pipettiert und in einem Biozym-DNA-Cycler unter den angegebenen Bedingungen (Tab. 9 im Anhang) zur Reaktion gebracht. Die erhaltenen PCR-Produkte werden mittels Agarose-Gelelektrophorese und Ethidiumbromidfärbung sichtbar gemacht.

4.8 Semiquantitative Polymerase-Kettenreaktion

Die semiquantitative Polymerase-Kettenreaktion wurde nach dem Verfahren von Platzer et al.¹⁹⁶ durchgeführt, indem die zu untersuchenden cDNAs unter Verwendung eines kompetitiven Kontrollfragmentes (pMCQ) im PCR-Ansatz auf einen β -Aktin Wert von 4×10^6 Moleküle/PCR-Ansatz eingestellt werden. Das aus dem Plasmid pMCQ selektionierte Kontrollfragment weist spezifische Primer-Bindungssequenzen für β -Aktin auf und wird ausgehend von einer Stockkonzentration von 2×10^{10} Moleküle/PCR-Ansatz in Konzentrationen von 1×10^7 bis 4×10^5 Molekülen/PCR-Ansatz eingesetzt. Aus diesem Grund kommt es während der PCR-Reaktion zu einem Konkurrenzverhalten zwischen dem Kontrollfragment und der Proben-cDNA um die eingesetzten β -Aktin Primer. Durch Verwendung unterschiedlicher Konzentrationen des Kontrollfragmentes in mehreren PCR-

Ansätzen ist die Konzentration feststellbar, die zu einer gleichen Bandenstärke von Kontrollfragment und Proben-cDNA führt, d. h. gleiche Konzentration im PCR-Ansatz. Die in Tab. 8 (im Anhang) angegebene β -Aktin PCR-Mischung ist dahingegen modifiziert, das 5 μ l Kontrollfragment an Stelle von 5 μ l Aqua dest. pro Ansatz pipettiert wurden. Die erhaltenen PCR-Produkte werden mittels Agarose-Gelelektrophorese und Ethidiumbromidfärbung sichtbar gemacht. Beide Fragmente unterscheiden sich im Agarosegel in ihrer Bandengröße – Kontrollfragment (265 bp) und Proben-cDNA (348 bp).

4.9 Agarose-Gelelektrophorese

Zur exakten Trennung der verwendeten Fragmente werden die PCR-Proben auf ein 1,5%iges Agarosegel aufgetragen und bei 5 V/cm für 1,5 h laufen gelassen. Die Gele befinden sich während der Elektrophorese in 1x TBE-Puffer, welcher besonders für die Auftrennung kleinerer Fragmente (< 1kb) geeignet ist und eine große Pufferkapazität besitzt. Um die DNA-Banden im Agarosegel sichtbar zu machen, wird dem Agarosegel Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0,5 μ g/ml zugegeben. Die amplifizierten DNA-Banden werden am Herolab mittels UV-Licht sichtbar und können so ausgewertet werden.

4.10 In Situ-Hybridisierung

4.10.1 Nachweis des CVB3-Kapsid-Protein-Gens VP1

Der Nachweis viraler RNA im Myokard erfolgt durch die In Situ-Hybridisierung (ISH) mit einer Digoxigenin (DIG)-markierten DNA-Sonde gegen das CVB3-Kapsid-Protein-Gen VP1. Für die Herstellung der Sonde werden HeLa-Zellen mit CVB3 Mü/J (Nancy) mit einer Dosis von 1×10^4 pfu infiziert. Die RNA ist nach dem Arbeitsprotokoll des „RNeasy Mini-Kits“ der Firma QUIAGEN isoliert und eine reverse Transkriptase (siehe 4.7) durchgeführt wurden. Die VP1-DNA-Sonde ist über eine PCR mit DIG-markierten dNTPs aus dem PCR-Sonden-Synthese Kit der Firma Roche unter Verwendung von spezifischen VP1 Primern hergestellt.

Formalinfixierte, in Paraffin eingebettete, 6 μ m dicke Schnitte von Myokardpräparaten werden über Nacht bei 56°C getrocknet und mit Xylolbehandlung (2x 10 min) entparaffiniert. Die Entfernung des restlichen Xylols und die Hydratisierung der Myokardschnitte erfolgt über eine absteigende Ethanolreihe (10 min in 100%igen Ethanol und anschließend jeweils 5 min in 95%-, 70%- und 50%igem Ethanol). Anschließend erfolgt ein Protease VIII-Verdau (Proteasestammlösung 500 μ g/ml, SIGMA), verdünnt in PBS 1:10 für 30 min bei 37°C in einer feuchten Kammer. Die Schnitte werden 1x 5 min in Aqua dest. gewaschen und eine aufsteigende Ethanolreihe durchgeführt, wobei die Objektträger jeweils 5 min in 70%- 95%- und 100%igen Ethanol gestellt werden. Die ISH gegen das CVB3-Kapsid-Protein-Gen VP1 erfolgt mittels DIG-markierter VP1-DNA Sonde. Hierzu wird die VP1-DNA Sonde vor dem

Auftragen auf die Myokardschnitte 1:5 in Aqua dest. verdünnt, 20 min bei 95°C inkubiert und 5 min auf Eis gelagert. Nachfolgend wird nochmals eine 1:10 Verdünnung mit Hybridisierungspuffer vorgenommen, diese für 5 min bei 95°C denaturiert und anschließend auf Eis bis zur Verwendung gelagert. Die Sonde wird auf die Myokardschnitte gegeben und diese mit Deckgläsern abgedeckt. Als Negativkontrolle werden konsekutive Schnitte mit Hybridisierungspuffer versehen und in gleicher Weise behandelt. Zur gesteigerten Expression und Sondenbindung werden die Schnitte samt Sonde optional für 8 min bei 95°C denaturiert. Die Hybridisierung erfolgt in einer feuchten Kammer bei 37°C für 16 h. Ungebundene VP1 Sonde wird am Folgetag mit einer stringenten Formamidersatzlösung entfernt, indem die Schnitte in einer Küvette mit Formamidersatzlösung für 20 min gewaschen werden. Zum immunologischen Nachweis der Sonde wird der unspezifische Hintergrund der Myokardschnitte mit Blockierungsreagenz (Stammlösung 1:10 in Puffer 1 verdünnt) für 30 min abgesättigt. Der aufgetragene Antikörper (Anti-DIG-AP, Fab-Fragment), der zuvor in Blockierungslösung 1:500 verdünnt wird, verbleibt 1 h auf den Präparaten, die im Anschluss 3x 5 min mit PBS gewaschen werden. Die Farbreaktion erfolgt über BCIP/NBT-Reagenz (1:50 in Puffer 3) für 2 h bei Raumtemperatur und wird mikroskopisch kontrolliert. Die Farbreaktion wird mit PBS abgestoppt, die Myokardpräparate werden mit Hämatoxylin (5 min) gefärbt, dann zum Bläuen für 1 min in Leitungswasser gestellt und mit Glycerol-Gelantine dauerhaft eingebettet.

4.10.2 Nachweis von PDGF-C

Als Nachweis der gesteigerten PDGF-C-Expression im Myokardgewebe wird eine ISH mit einer RNA-sense- und RNA-antisense-Sonde durchgeführt, da durch endogen vorhandenes PDGF-C im Myokard konsekutive Kontrollschnitte nicht ausreichen. Die benötigten Sonden für die Detektion von PDGF-C mRNA werden durch PCR-Amplifikation mit einer PfU-Polymerase (STRATAGENE, Ja Jolla, USA) hergestellt. Als Template dient PDGF-C-cDNA („Fallotein“-cDNA), das freundlicherweise von Dr. Yuan-Jang Tsai, Division of Reproduction and Endocrinology, Department of Medical Research, Mackay Memorial Hospital, Tamshui, Taiwan zur Verfügung gestellt wurde. Das 625 bp große PCR blunt-end-Fragment wird in einen Eco-RV-verdauten pBluescript-Vektor II KS(+) kloniert. Zur Synthese der sense- bzw. antisense-RNA-Sonde wird das Plasmid mit BamH I linearisiert. Über eine *in vitro* Transkription mit dem DIG-RNA-Labeling Kit (Roche, Mannheim) unter Verwendung der T3- bzw. T7-RNA-Polymerasen werden die spezifischen Sonden erzeugt. Die linearisierten RNA-Sonden werden mit 2,5 mM Lithiumchlorid-Ethanol gefällt, aliquotiert und bei -80°C bis zur Verwendung gelagert.

Die PDGF-C-RNA ISH ist nach dem Protokoll von Diikman et. al.¹⁹⁷ durchgeführt wurden. 6 µm dicke in Paraffin eingebettete Myokardschnitte sind in Xylol (2x 10 min) fixiert und über

eine absteigende Ethanolreihe (10 min in 100%igem Ethanol und anschließend jeweils 5 min in 95%-, 70%- und 50%igem Ethanol) hydriert worden. Die Myokardpräparate werden mit Hybridisierungspuffer in einer feuchten Kammer für 1 h bei 37°C vorhybridisiert. Der Nachweis von PDGF-C mRNA im Gewebe erfolgt mittels Inkubation einer mit 200 ng/ml DIG-markierter antisense- (T7) bzw. sense- (T3) Sonde in Hybridisierungspuffer, in einer feuchten Kammer bei 37°C für 16 h. Durch verschiedene stringente Waschschnitte (2x SSC für 5 min bei 37°C, dann mit 60%-igem Formamid in 0,2x SSC für 3x 5 min bei 37°C und schließlich 2x SSC für 2x 5 min bei RT mit jeweils einer Menge von 100 µl/Schnitt) am Folgetag wird ungebundene PDGF-C sense- bzw. antisense-Sonde von den Myokardschnitten entfernt. Die Schnitte werden anschließend 1x 5 min mit Waschpuffer gewaschen. Die Blockierung der Schnitte erfolgt analog der VP1 ISH mit Blockierungspuffer für 30 min bei RT. Die Immundetektion wird mit einem Anti-DIG-AP (Fab-Fragment)-Antikörper, in einer Verdünnung von 1:200 in Blockierungspuffer für 2 Stunden bei RT vorgenommen. Überschüssiger, ungebundener Antikörper wird durch 2x 5 min waschen in Waschpuffer und 1x 10 min waschen mit Detektionspuffer von den Schnitten entfernt. Die Farbreaktion wird ebenso wie bei der VP1 ISH mit NBT/BCIP-Stock-Lösung unter mikroskopischer Kontrolle durchgeführt. Das Abstoppen der Reaktion erfolgt mit Waschpuffer, die Präparate werden mit flüssiger Glycerol-Gelatine dauerhaft verschlossen und mikroskopisch ausgewertet.

4.11 Immunhistochemischer Nachweis von PDGF-Isoformen

Das immunhistochemisch zu untersuchende Myokardgewebe wird in Cryomatrix (Thermo Shadon, Pittsburgh, USA) eingebettet, in flüssigen Stickstoff eingefroren und bei -70°C gelagert. Das gefrorene Gewebe wird bei -20°C am Kryotom in 10 µm Scheiben geschnitten. Diese werden auf ungekühlte PLL-beschichtete Objektträger aufgeschmolzen und bei RT für mind. 2 h oder über Nacht luftgetrocknet. Zur immunhistochemischen Detektion werden die Objektträger 3 min in Aceton fixiert, luftgetrocknet, die Herzschnitte mit einem PAP-Fettstift umrandet und 2 min in PBS gewaschen. Die Hemmung der endogenen Peroxidase erfolgt in 0,04%iger H₂O₂-Lösung für 30 min bei RT. Während der Inaktivierung mit H₂O₂ ist auf Bläschenbildung auf den Schnitten zu achten. Anschließend werden die Objektträger 3x 4 min in PBS gewaschen. Alle folgenden Schritte werden in einer feuchten Kammer durchgeführt, damit die Schnitte nicht austrocknen. Die Absättigung des endogenen Biotins erfolgt durch eine Inkubation mit 0,01% Avidin und 0,1% Biotin, verdünnt in PBS für je 30 min bei RT. Die Schnitte werden zwischen den Inkubationsschritten 3x 4 min mit PBS gewaschen. Um unspezifische Reaktionen im Myokardschnitt zu verhindern, wird dieser mit einem Blockierungspuffer (2% Magermilch, 1% FCS in PBS) für 30 min bei RT absorbiert. Der Blockierungspuffer wird nur abgespült und danach der entsprechende Primärantikörper verdünnt in PBS (Tab. 11 im Anhang) auf die Myokardschnitte gegeben. Parallel zu jedem

untersuchten Antikörper wird eine Negativkontrolle eines Myokardschnittes mitgeführt, der anstelle des Primärantikörpers mit PBS inkubiert wird. Die Inkubation erfolgt ü. N. bei 4°C. Ungebundener Primärantikörper wird am Folgetag 3x 4 min mit PBS abgewaschen und ein biotinylierter Sekundärantikörper (mit 2% MS) in entsprechender Verdünnung (Tab. 11 im Anhang) für 30 min bei RT auf die Schnitte gegeben. Im Anschluss erfolgt wiederum ein Waschen der Objektträger für 3x 4 min in PBS. Zur Signalverstärkung wird Streptavidin-Peroxidase (SPK; Verdünnung 1:300 in PBS) an den Biotin-gekoppelten-Sekundärantikörper für 30 min bei RT gebunden. Überschüssiges SPK wird 3x 4 min mit PBS abgespült. Die Farbdetektion erfolgt über chromogenes Substrat (3-Amino-9-Ethyl-Carbazol). Die Färbungen im Myokardpräparat werden am Mikroskop kontrolliert. Im Folgenden werden die Schnitte 2x 4 min in PBS und 1x 4 min in Aqua dest. gewaschen. Die Desinfektion des infektiösen Materials findet für 15-20 min in einer 4% Formalinlösung statt. Zur Sichtbarmachung der Infiltrate und Gegenfärbung der Zellkerne im Myokard werden die Schnitte für 15 min in Hämatoxylin gegeben und nachfolgend zum Bläuen mit Leitungswasser gespült. Die Schnitte werden mit Aquatex eingedeckelt und am Mikroskop ausgewertet.

Die Spezifität der käuflich erworbenen polyklonalen Antikörper (PDGF-A, PDGF-B, PDGFR- α , phospho-Akt) ist mit einer IgG-Isotypkontrolle vom Kaninchen (4 μ g/ml) geprüft worden, in dem Kaninchen-IgG anstelle des verwendeten Antikörpers auf die Myokardschnitte gegeben wurde. Für den Antikörper gegen die Isoform PDGF-C konnte ein Blockierungspeptid (CDCVCRGNAGG-Amide) zum Nachweis der PDGF-C-Spezifität verwendet werden. Dieses wird dem Antikörper vor dem Auftragen auf den Myokardschnitt in einer Konzentration von 200 μ g/ml beigemischt. Die Blockierung erfolgt bei einer Inkubation von 1 h bei 37°C.

4.12 Bestimmung von PDGF-Aktivität im extrahierten Myokardgewebe

Zur Bestimmung der PDGF-Konzentration im Myokardgewebe werden konfluent gewachsene Swiss 3T3 Fibroblasten in einer 24 well Mikrotiterplatte mit serumfreien DMEM/Medium für 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Myokardgewebe von MHC Klasse II knockout Mäusen und C57BL/6 Wildtypmäusen von verschiedenen CVB3-Infektionszeitpunkten (7, 21 und 56 p. i.) wird in einer PBS-haltigen Lösung homogenisiert und für 10 min auf die 3T3 Fibroblasten gegeben. Zum Vergleich und zur Standardisierung werden die Zellen unter denselben Bedingungen mit verschiedenen Konzentrationen (1,0; 2,5 oder 5,0 ng/ml) PDGF-BB inkubiert. Von der auf Eis gestellten Mikrotiterplatte werden die Überstände abgesaugt, die Zellen 1x mit PBS gewaschen und anschließend in 0,2 ml Triton-Lysispuffer lysiert und für 15 min bei 4°C und 14000 U/min zentrifugiert. Die im Überstand enthaltenen Glycoproteine werden an Weizenkeim-Lecitin-Agarose bei 4°C für 30 min gebunden. Das

gebundene Material wird 2x mit Triton-Lysispuffer und 1x mit HNTG-Puffer gewaschen und anschließend mit 5 µl 6x A-Puffer versetzt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Es erfolgt ein SDS-PAGE und Immunblot mit Anti-Phosphotyrosin-Antikörper (4G10). Die entstehende Bande des phosphorylierten PDGFR (185 kDa) wird quantifiziert und densitometrisch am Computer mit dem Bearbeitungsprogramm „Herolab“ ausgewertet.

4.13 Detektion von PDGFR-Aktivierung mittels Immunpräzipitation

Myokardgewebe von MHC Klasse II knockout Mäusen, die für 7 Tage mit 150 mg/kg STI571 oder entsprechender Vergleichslösung behandelt worden, wird unter Verwendung eines Triton-Lysispuffer (im Verhältnis 100 mg Gewebe/1000 µl Puffer) im Ultra-Turrax homogenisiert. Die Homogenisate werden für 20 min auf Eis inkubiert und anschließend die Zelltrümmer durch Zentrifugation bei 14000 U/min für 20 min und 4°C entfernt. Die Gewebelysate werden unter Zugabe von 1 µg/ml PDGF-BB, 5 mM MnCl₂ und 300 µM ATP bei 4°C für 20 min inkubiert. Die im Anschluss durchgeführte Immunpräzipitation von PDGFR aus den Lysaten erfolgt mit einem Mix aus vorgebundenen PDGFR-α- und PDGFR-β-Antikörper (Konzentration von je 2 µg) an Protein-A-Sepharose ü. N. bei 4°C auf einen Schüttler. Die Präzipitate werden am Folgetag 2x mit Triton-Lysispuffer und 1x mit HNTG-Puffer gewaschen und im Anschluss die PDGFR-Phosphorylierung mittels SDS-PAGE und Immunblot unter Verwendung eines Anti-Phosphotyrosin-Antikörpers (4G10) durchgeführt. Zusätzlich ist aus den Gewebelysaten mittels Immunblot unter Verwendung eines Anti-Vinculin-Antikörpers, ein Konzentrationsvergleich der aufgetragenen Proben durchgeführt worden.

4.14 SDS-PAGE und Immunblot

Durch die Kombination beider Methoden ist eine exakte Trennung und Nachweismöglichkeit von Proteinen bzw. die Modifikation an Proteinen oder ihrer Phosphorylierung möglich. Falls nicht anders beschrieben, werden die zu untersuchenden Lysate mit 6x A-Probenpuffer versetzt, 5 min bei 100°C denaturiert und auf das Poly-Acryl-Amid-Gel (PAA-Gel) aufgetragen. Die Elektrophoresebedingungen für ein 7,5% PAA-Gel sind 30 mA, 100 V für 1 Stunde. Das PAA-Gel wird anschließend für den Immunblot weiter verwendet. Der Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran erfolgt mittels Semi-Dry-Verfahren bei 17 V und 2 mA/cm² Membran für 2 h. Die verwendeten Antikörper (Tab. 3.7) sind in TBS-T 0.01% Puffer verdünnt, der auch zum Blocken und Waschen der Membran verwendet wird. Die Proteine werden durch eine Chemolumineszenz-Reaktion der Meerrettich-Peroxidase (HRP) mit ECL-Western Lightning als Substrat auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht.

4.15 Herzgewebe-Extraktion zur Analyse von STI571 (Glivec)

Die Konzentrationsbestimmung von STI571 im Myokardgewebe übernahm in dankenswerter Weise Dr. Gilles-Jaques Riviere (NOVARTIS Pharma, Rueil-Malmaison, Frankreich). Da bei der Versendung von infektiösem Material große Vorsicht geboten ist, erfolgten die ersten Aufarbeitungsschritte für die Analyse von STI571 im Herzgewebe nach dem Protokoll von Dr. Riviere im Institut für Virologie und Antivirale Therapie in Jena.

Das entnommene Herzgewebe wird bei der Organentnahme gewogen und bei -80°C tiefgefroren. Zu 100 mg Herzgewebe wird 400 μl PBS zugegeben und die Proben am Ultra-Turrax homogenisiert. 200 μl des PBS-Homogenisates werden abgenommen und zur Präzipitation der Proteine mit 250 μl Acetonitril vermischt. Die Proben werden 1 min am Vortexer gemischt, anschließend bei 2500 U/min für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und bis zur Versendung bei -20°C gelagert. Das versendete Material muss Virusfrei sein. Stichprobenhaft wurden ausgewählte Myokardextrakte, nach dem beschriebenen Protokoll aufgearbeitet. Diese Proben sind in einer Speedvac Zentrifuge getrocknet und das Pellet in äquivalenten PBS-Volumen gelöst wurden. Die Detektion von möglichen CVB3-Partikeln erfolgte mittels TCID₅₀-Test (siehe 4.4).

4.16 Statistik

Ausgehend von den ermittelten Stichproben erfolgt die Berechnung der Mittelwerte und der Standardabweichung mit dem Computerprogramm Excel (Version Microsoft XP). Da sich die Anzahl der untersuchten Stichproben auf ein Minimum beschränkt und somit nicht von einer normalverteilten Grundgesamtheit und gegebenenfalls von Varianzhomogenität ausgegangen werden kann, muss ein voraussetzungsfreies Verfahren angewandt werden, welches lediglich die ordinale Information der Daten auswertet¹⁹⁸. Es wird der Vergleich von zwei unabhängigen Stichproben (U-Test nach Mann und Whitney) hinsichtlich ihrer zentralen Tendenz, als nichtparametrischer Test, angewandt (signifikanter Unterschied bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$). Die Berechnung der Werte erfolgt mit dem Computerprogramm SPSS (Version 11.5 für Windows, SheePS Counting Software).

5. Ergebnisse

5.1 Erhöhte Expression von PDGF-Isoformen in der CVB3-induzierten Herzmuskulenzündung

5.1.1 Histologische Untersuchung von CVB3-infizierten Herzen

Für die Untersuchung eines fortschreitenden Krankheitsverlaufes einer CVB3-induzierten Myokarditis in Abhängigkeit von der Zeit post infectionem (p. i.) wurden CD4-T-Zell-defiziente MHC Klasse II knockout Mäuse im Vergleich zu immunkompetenten C57BL/6 Mäusen mit der Virusvariante CVB3-Mü/J (1×10^4 pfu) infiziert. Die Analyse der myokardialen Infektion erfolgte an Zeitpunkten, die nach früheren Untersuchungen⁷¹ charakteristisch für den Krankheitsverlauf sind – Tag 7 (akute Myokarditis), Tag 21 (chronische Myokarditis) und Tag 56 (chronische Myokarditis, massive Fibosierung). Für dieses Mausmodell konnte bereits in einer konventionell geführten Tierhaltung gezeigt werden, dass immundefiziente MHC Klasse II knockout Mäuse sowie immunkompetente C57BL/6 Mäuse eine akute Myokarditis ausbilden. Diese heilte in den immunkompetenten Tieren komplett aus, während es in den immundefizienten Mäusen bis zum Untersuchungszeitpunkt – 21 Tage p. i. – zu einer Persistenz der Infiltrate und Entwicklung einer chronischen Myokarditis kam⁷¹. Diese bekannten histologischen Parameter einer CVB3-Infektion wurden an SPF-gehaltenen Mäusen beider Tierstämme ein weiteres Mal untersucht.

Weiterhin wurden nicht-infizierte Kontrolltiere beider Stämme parallel untersucht, um den Einfluss Mausstamm-spezifischer Faktoren auszuschließen. Als Parameter einer stattgefundenen Virusinfektion war die histologische Beurteilung der Pankreaszerstörung notwendig⁷¹. Danach erfolgte die Entscheidung über die Einbeziehung der betroffenen Tiere in die weiteren Untersuchungen. Die histologische Auswertung des Myokards erfolgte lichtmikroskopisch an mit Hämatoxylin/Eosin und mit Siriusrot gefärbten Paraffin-Präparaten. Der Schweregrad der entstehenden viral-induzierten Herzmuskelschädigung, deren Folge schwere myokardiale Läsionen und Entwicklung von Fibrose sein kann, wurde anhand von im Labor festgelegten Kriterien von 0 bis 3 ausgewertet (Tab. 10 im Anhang)⁷¹.

5.1.1.1 Infiltration des Myokards

Der Nachweis von infiltrierenden Zellen im Myokard erfolgte mittels Hämatoxylin/Eosin Färbung. Das humanpathogene Coxsackie-B3 Virus induzierte in beiden untersuchten Mäusestämmen bis 7 Tage nach CVB3-Infektion eine schwere akute Myokarditis. Die entstehende Myozytenschädigung in beiden Mäusestämmen reichte von mehreren fokalen Entzündungszellen bis hin zu diffusen Infiltrationen, die zuweilen mit einer kompletten zellulären Durchsetzung der gesamten Ventrikelwand einhergingen (Abb. 6C und D). Ein Unterschied im Schweregrad der Infiltration zwischen beiden Mäusestämmen war nicht feststellbar. Hingegen ließen sich 21 bzw. 56 Tage nach CVB3-Infektion zwischen beiden

Mäusestämmen deutliche histologische Unterschiede in den Myokardschnitte erkennen. Die CVB3-induzierte Myokarditis in C57BL/6 Mäusen heilte bis zum 21. Tag p. i. aus und entsprach histologisch dem Bild der nicht-infizierten Kontrolltiere (Abb. 6F). Entsprechend ließen sich auch 56 Tage p. i. im Herzmuskelgewebe dieser Mäuse keine Anzeichen von Entzündungszellen oder Infiltraten nachweisen (Abb. 6H). Im Gegensatz dazu war der histologische Befund bei MHC Klasse II knockout Mäusen an den untersuchten Infektionszeitpunkten different. Bis einschließlich 56 Tage p. i. konnten hochgradige myokardiale Schädigungen der Myozyten detektiert werden, die teilweise große Bereiche der Ventrikelwand destruktiv veränderten (Abb. 6E und G).

5.1.1.2 Bewertung der Fibrose im Myokard

Die pathologische Vermehrung des Bindegewebes im Myokard als Folge einer CVB3-Infektion konnte durch Färbung der histologischen Präparate mit Siriusrot nachgewiesen werden. Dadurch werden die Kardiomyozyten gelb und das Bindegewebe des Interstitiums sowie die dort befindlichen Gefäße rot gefärbt. Die Lokalisation des veränderten Bindegewebes im Myokard korrespondierte mit den entzündeten Arealen im Bereich der Infiltrate, die mit Hilfe der Hämatoxylin/Eosin Färbung detektiert wurden. Zum Zeitpunkt der akuten Infektion – 7. Tag p. i. – zeigte sich in den Herzmuskelpräparaten von Versuchstieren beider Mäusestämmen eine Anreicherung von lockerem Bindegewebe (Abb. 7C und D). Die Lokalisation dieser netzartigen Strukturen korrespondierte mit den Stellen, an denen mit der HE-Färbung Infiltrate im Myokardgewebe detektiert wurden (Abb. 6C und D). Dieses Granulationsgewebe füllte im Herzmuskel die Bereiche aus, die aufgrund des zytopathischen Effektes von CVB3 zerstört wurden. Deutliche Unterschiede zwischen beiden Mäusestämmen waren am 21. bzw. 56. Tag nach CVB3-Infektion zu beobachten (Abb. 7E und F sowie G und H). Im Herzmuskelgewebe der immunkompetenten C57BL/6 Mäuse war keine Anreicherung von proliferierendem Bindegewebe mehr sichtbar. Das Myokardgewebe entsprach dem der nicht-infizierten Kontrollmäuse und zeichnete sich durch eine einheitliche gelbe Färbung der Kardiomyozyten sowie lediglich durch eine rote Anfärbung der Gefäßwände und des Interstitiums aus (Abb. 7F). Hingegen war durch die Persistenz der Infiltrate im Myokardgewebe von immundefizienten MHC Klasse II knockout Mäusen – 21 Tage p. i. – eine moderate bis großflächige Anreicherung von Bindegewebe deutlich zu erkennen. Davon waren einzelne Muskelareale betroffen oder es erfolgte teilweise auch ein bindegewebsartiger Umbau der kompletten Ventrikelwand (Abb. 7E). Die Myokardpräparate vom 56 Tage p. i. wiesen ein deutliches Fortschreiten dieses myokardialen Umbauprozesses im Vergleich zum 21. Tag p. i. auf. Noch größere Bereiche des Myokards waren durch fibrotisches Gewebe ersetzt. Diese pathologische Veränderung führt sehr wahrscheinlich zu

einem funktionsunfähigen Myokardgewebe mit Einschränkungen in der Pumpleistung (Abb. 7G).

Zusammenfassend war feststellbar, dass sich eine CVB3-Mü/J-Infektion bei MHC Klasse II knockout Mäusen und C57BL/6 Wildtypmäusen in einer akute Myokarditis manifestierte, die bis zum 21. Tag p. i. in den immunkompetenten Mäusen ausheilte. Die Persistenz der Myokardentzündung und die Zunahme von interstitiellem Bindegewebe im Myokard von MHC Klasse II knockout Mäusen – 21 bzw. 56 Tage p. i. – waren der Beleg für einen chronischen Krankheitsverlauf. Die Ergebnisse unter SPF-Bedingungen bestätigten die bereits erbrachten Befunde aus der konventionellen Tierhaltung. Damit kann ausgeschlossen werden, dass die Exposition gegenüber zusätzlichen Keimen einen Bezug zum früher beschriebenen Krankheitsverlauf geleistet hat. Die beschriebenen Pathologien sind wahrscheinlich ausschließlich auf die CVB3-Infektion zurückzuführen.

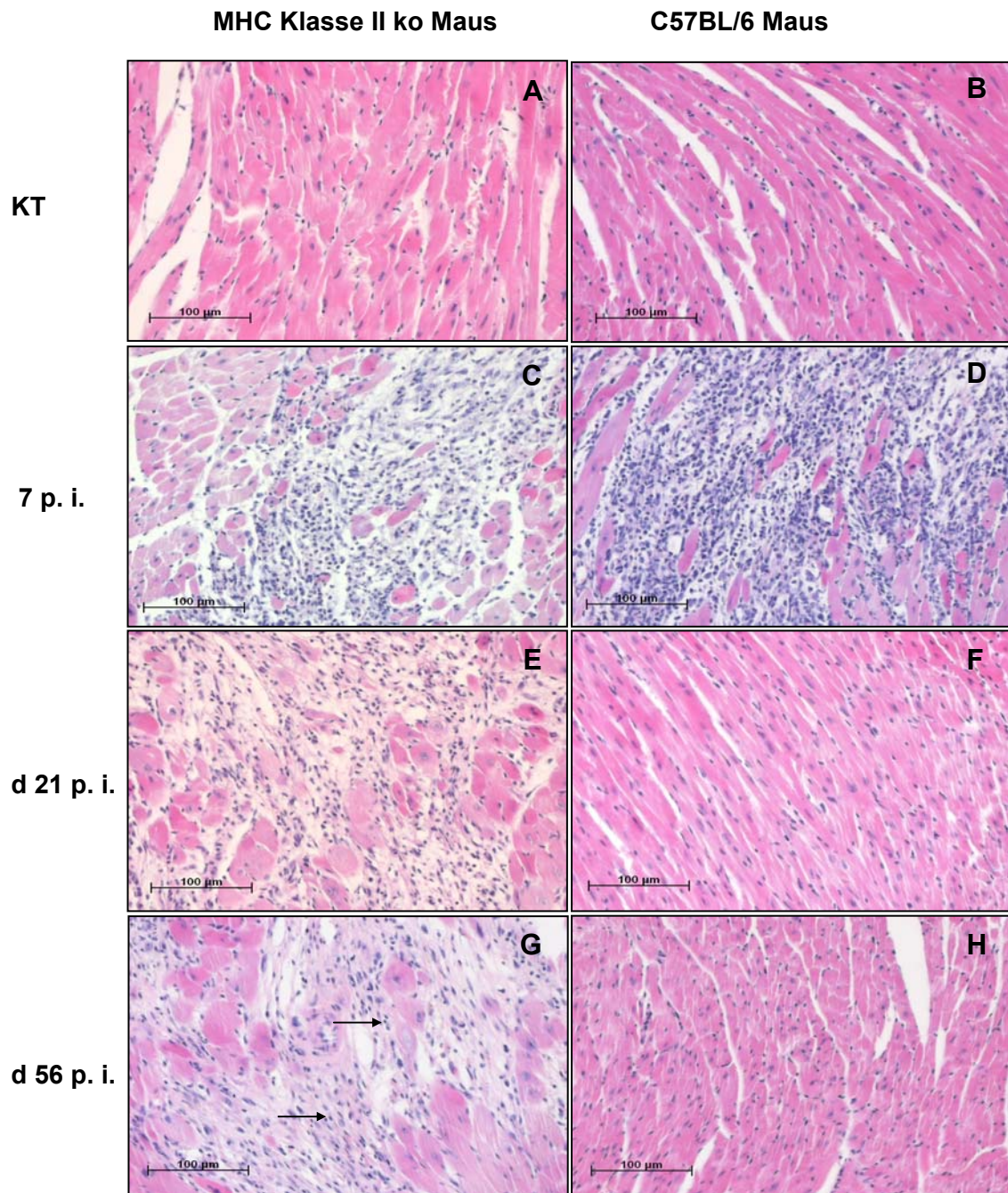


Abb. 6: Histologische Darstellung der Infiltration im Myokard nach Infektion mit CVB3. Vergleich von MHC Klasse II ko (A, C, E und G) und immunkompetenten C57BL/6 Mäusen (B, D, F und H). **A+B:** Die Kontrolltiere beider Stämme waren frei von Entzündungszellen. **C+D:** Am 7 d p. i. entwickelten MHC Klasse II ko (C) und C57BL/6 Mäuse (D) eine akute Myokarditis mit multifokalen Läsionen und starker Infiltration. **E+F:** Am 21. d p. i. heilte die Myokarditis bei immunkompetenten Mäusen (F) vollständig aus, während immundefiziente MHC Klasse II ko Mäuse eine persistierende Infiltration im Myokard aufwiesen (E). **G+H:** Nach 56 d p. i. glich das Herzmuskelgewebe immunkompetenter C57BL/6 Mäuse (H) histologisch dem Bild von nicht-infizierten Kontrollmäusen (B). Zu diesem Zeitpunkt der Infektion stellte eine moderate bis starke Infiltration (Pfeile) des Myokards und geschädigte Myozyten die Befunde der histologischen Präparate von MHC Klasse II ko Mäusen dar. (Hämatoxylin/Eosin Färbung; ko: knockout; KT: Kontrolltiere; d: Tag; 100-fach Vergrößerung)

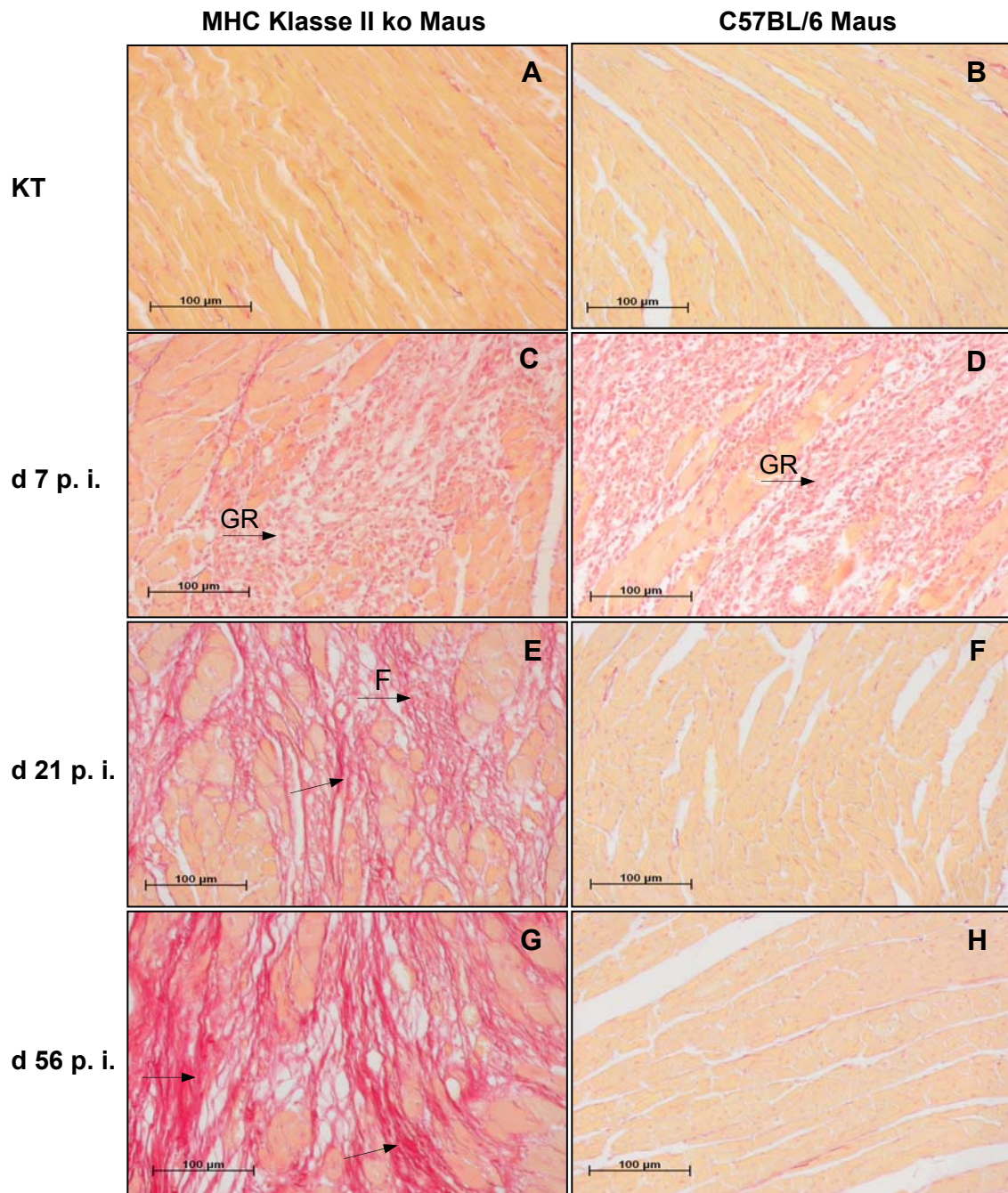


Abb. 7: Nachweis von Fibrose im Myokard nach CVB3-Infektion. Vergleich von MHC Klasse II ko (A, C, E und G) und immunkompetenten C57BL/6 Mäusen (B, D, F und H). **A+B:** Bei den Kontrolltieren beider Stämme waren keine Anzeichen von Fibrose erkennbar. **C+D:** Am 7. d p. i. war aufgelockertes Bindegewebe in beiden Mäusestämmen detektierbar. Dieses netzartige Bindegewebe entsprach den Lokalisationen der Infiltrate (Abb. 7C+D). Es handelte sich dabei um Granulationsgewebe (GR). **E+F:** Am 21. d p. i. waren die immunkompetenten Mäuse frei von fibrotischen Veränderungen (F). Die MHC Klasse II ko Mäuse (E) entwickelten eine starke Fibrosierung des Myokards (Pfeil), welche zum bindegewebigen Umbau ganzer Muskelareale führte. **G+H:** 56 d p. i. glich das Herzmuskelgewebe immunkompetenter C57BL/6 Mäuse (H) histologisch dem Bild von nicht-infizierten Kontrollmäusen (B). Im Myokard von MHC Klasse II ko Mäusen (G) war eine Zunahme der myokardialen Fibrose im Vergleich zum 21. d p. i. zu beobachten (Pfeile). (Siriusrot-Färbung; ko: knockout; KT: Kontrolltiere; d: Tag; 100-fache Vergrößerung)

5.1.2 Expressionsmuster von Zytokinen und PDGF-Isoformen

5.1.2.1 Zytokinexpression

Um zu untersuchen, ob der Immundefekt der CD4-T-Zell defizienten MHC Klasse II knockout Mäuse einen Einfluss auf die Expression von Zytokinen im Herzmuskelgewebe hat, wurden ausgesuchte Zytokine, die den Infektionsverlauf beeinflussen können, an markanten Infektionszeitpunkten – 7, 21 und 56 Tage – nach CVB3-Infektion in beiden Mäusestämmen analysiert und mit nicht-infizierten Kontrolltieren verglichen. Dazu wurde, wie unter Methoden beschrieben, die mRNA aus dem Herzgewebe isoliert. In die Untersuchung gingen pro Versuchszeitpunkt und Mausstamm 5 bis 9 Tiere ein. Um Veränderungen im Expressionsspiegel der zu untersuchenden Zytokine und Wachstumsfaktoren im Verlauf der CVB3-Infektion nachzuweisen, wurden die Myokardproben durch eine semiquantitative PCR auf einen konstanten β -Aktin Wert eingestellt. In der semiquantitativen β -Aktin PCR konkurrierte die zu analysierende Myokard-cDNA mit einem kompetitiven Fragment in verschiedenen Verdünnungen um die spezifischen β -Aktin Primer. In Abb. 8 ist das Beispiel einer so quantifizierten Proben-cDNA (348 bp/ β -Aktin) und der kompetitiven Fragmentbande (264 bp/Kontrollfragment) dargestellt. Die Proben-cDNA wurde in konstanter Menge in die Reaktion eingesetzt, wohingegen das kompetitive Fragment in Verdünnungen von 10^7 bis 10^4 zum PCR Ansatz gegeben wurde. Im dargestellten Beispiel glichen sich beide Proben bei einer Fragmentverdünnung von 4×10^6 Molekülen in der dargestellten β -Aktin Bandenstärke an. Dieses Ergebnis ließ den Schluss zu, dass in dieser Myokardprobe eine β -Aktin Konzentration von 4×10^6 Molekülen vorzufinden war.

Für den RNA-Nachweis mittels RT-PCR der Zytokine und Wachstumsfaktoren wurden alle Myokardproben auf einen konstanten Wert von 4×10^6 Molekülen β -Aktin eingestellt. Mit der Amplifikation der mRNA des antiviralen Zytokins IFN- β , der Zytokine IL-2, IFN- γ , IL-10 und IL-12_{p40} wurde eine Beteiligung des Immunsystems am myokardialen Entzündungsprozess demonstriert. Mit der Detektion von TNF- α , IL-1 α , IL-1 β und IL-6 wurde eine Reihe von Zytokinen getestet, die als spezifische Marker für Entzündungsprozesse im Myokard gelten. Die Amplifikation des CVB3-Kapsidgens VP1 gab zusätzlich zu dem mittels TCID₅₀ ermittelten Virustiter Aufschluss über die Viruspersistenz im Myokard. In Abb. 9 sind neben den Ergebnissen der PCR die histologische Bewertung für zelluläre Infiltration und Fibrose sowie der mit dem TCID₅₀-Test nachgewiesene Virustiter im Myokard dargestellt.

Zum Zeitpunkt der akuten Phase – 7 Tage p. i. – war im Myokard der Versuchstiere beider Mäusestämmen eine mäßige bis starke Expression der untersuchten Zytokine messbar. Dies ging mit dem Nachweis des Virusgenoms (VP1-Gen) einher, welches sich durch eine starke Expression zu diesem Infektionszeitpunkt auszeichnete und die durch den TCID₅₀-Test nachgewiesene Infektion in den Myokardproben bestätigte.

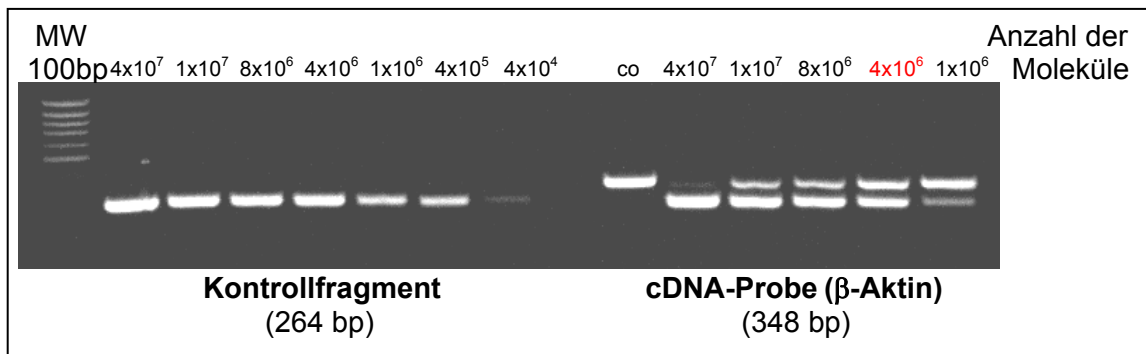


Abb. 8: Semiquantitative β -Aktin RT-PCR. Untersuchung einer Myokardprobe auf β -Aktin Expression unter Verwendung eines kompetitiven Kontrollfragmentes. Das Kontrollfragment wurde in Verdünnungen von 4×10^7 bis 1×10^4 in die PCR eingesetzt, die zu untersuchende Myokardprobe in Verdünnungen von 4×10^7 bis 1×10^6 . Beide Fragmente unterschieden sich im Agarosegel durch unterschiedliche Basenpaargrößen. (MW: Molekulargewicht; bp: Basenpaare; co: PCR ohne Kontrollfragment)

Das Zytokinmuster wies am Tag 7 p. i. keine Unterschiede in den Expressionssignalen zwischen beiden Mäusestämmen auf, ausgenommen die CD4-T-Zell relevanten Zytokine IL-2 und IL-10, die sehr schwach oder gar nicht im Myokard von MHC Klasse II knockout Mäusen nachweisbar waren (Abb. 9).

Die Untersuchungszeitpunkte der chronischen Phase – 21. und 56. Tag p. i. – waren für Myokardproben immunkompetenter Mäuse durch eine fehlende Expression des VP1-Gens gekennzeichnet. Dieser Befund korrelierte mit den Daten der Virustiterbestimmung und war konsistent mit der Ausheilung der akuten Myokarditis in diesen Mäusen (Abb. 9). Entsprechend konnte bei dem immunkompetenten Mausstamm eine Verringerung der Expression der Zytokine auf ein schwaches bzw. nicht mehr nachweisbares Niveau beobachtet werden. Das Expressionsmuster ähnelte dem nicht-infizierter Kontrollmäuse (Abb. 9). Im Vergleich dazu konnte an den Tagen 21 und 56 p. i. in immundefizienten Mäusen ein unverändert hohes VP1-Expressionsniveau detektiert werden. Dies belegte die Persistenz der viralen mRNA im Herzmuskelgewebe und bestätigte den mittels $TCID_{50}$ ermittelten unverändert hohen Virustiter (Abb. 9). Ebenso zeigten diese Mäuse persistierende hohe Zytokinspiegel (Abb. 9). Besonders die Zytokine $IFN-\gamma$, $TNF-\alpha$, IL-6 und IL-1 β waren an den beiden untersuchten Zeitpunkten der chronischen Phase in konstanter Expressionsstärke nachweisbar und stützten damit den Befund einer manifestierten chronischen Myokarditis in diesem Mausstamm (Abb. 9).

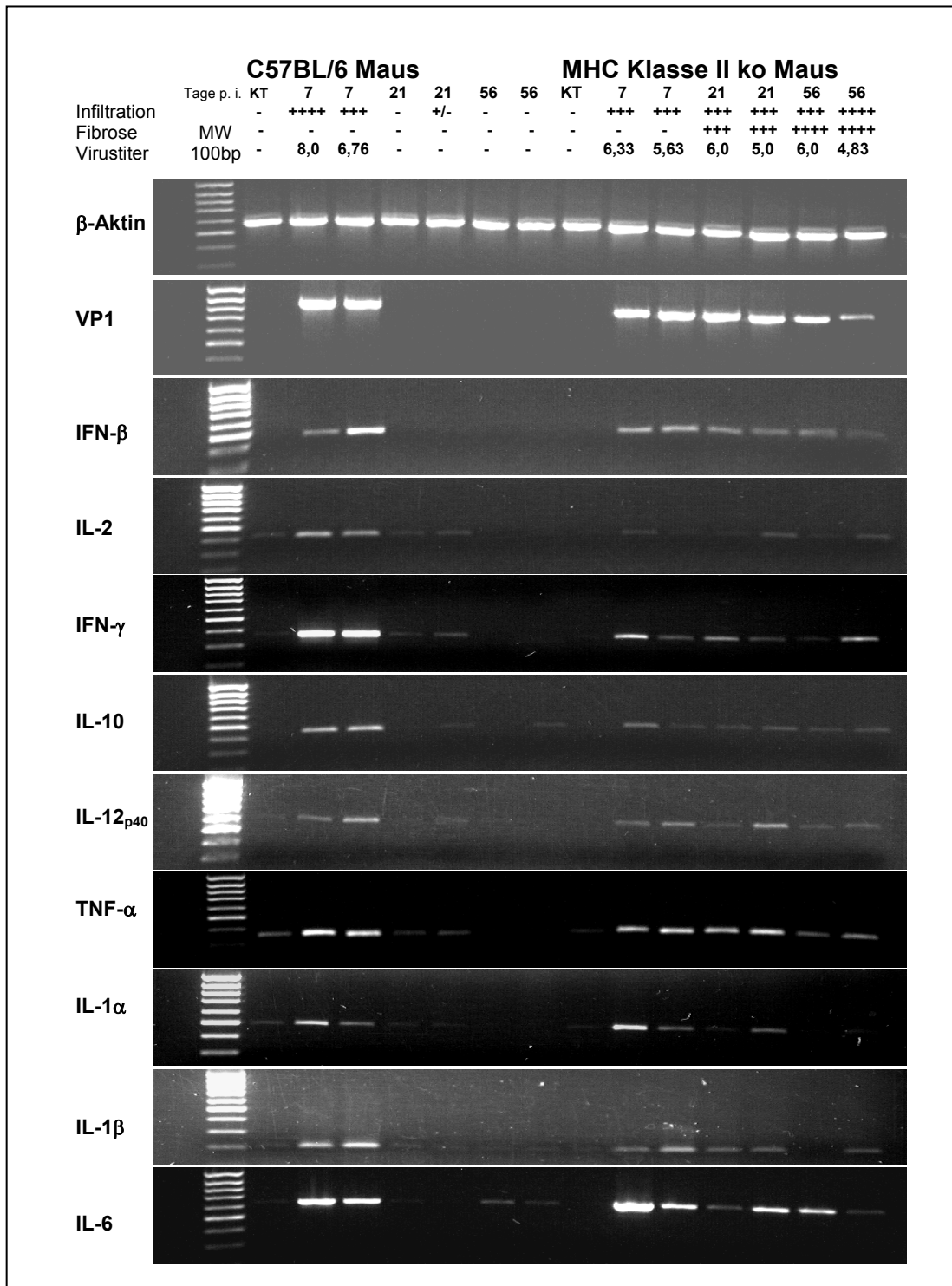


Abb. 9: Expression von entzündungsspezifischen Zytokinen im Myokard während einer CVB3-Infektion. Dargestellt ist die mRNA Expression von β -Aktin, VP1 sowie von spezifischen Zytokinen im Myokard von MHC Klasse II ko Mäusen und C57BL/6 Mäusen 7, 21 und 56 d p. i. im Vergleich zu nicht-infizierten Kontrolltieren. Angegeben sind zusätzlich die histologische Bewertung des Infiltrations- und Fibrosegrades der entsprechenden Mäuse sowie der Virustiter im Herzmuskel. (MW: Molekulargewicht; bp: Basenpaare, KT: nicht-infizierte Kontrolltiere; d: Tag; ko: knockout)

5.1.2.2 Expression von PDGF-Isoformen

Die Fibrosierung des Myokards als Folge eines chronischen Entzündungsprozesses trägt wesentlich zur Entstehung einer Herzinsuffizienz bei. Für die Entstehung der Fibrose stellt die Proliferation myokardialer Fibroblasten einen entscheidenden Faktor dar. Dieser Prozess kann durch verschiedene Wachstumsfaktoren, wie dem Blutplättchenwachstumsfaktor (platelet-derived growth factor/ PDGF) und seiner Rezeptoren, stimuliert werden.

Die Untersuchung der mRNA-Expression im Prozess der CVB3-induzierten Myokardfibrose erfolgte für die PDGF-Isoformen A, B und C. Die PDGF-D-Isoform wurde wegen ihrer geringfügigen Beteiligung an inflammatorischen Prozessen nicht analysiert.

In Abb. 10 sind neben der Expression der mRNA von PDGF-Faktoren zusätzlich die Amplifikation des β -Aktin und des CVB3-Kapsidgens (VP1) sowie die histologischen Befunde und der nachgewiesene Virustiter dargestellt. In Korrelation mit dem akuten Entzündungsprozess am 7. Tag p. i. konnte in den entsprechenden Herzen eine moderate bis starke Expression der untersuchten PDGF-Isoformen A, B und C festgestellt werden. Zwischen beiden Mäusestämmen bestanden zu diesem Infektionszeitpunkt keine Unterschiede in der Expression. Im Vergleich zu CVB3-infizierten Tieren wurden in nicht-infizierten Kontrollmäusen nur geringe mRNA-Spiegel der PDGF-Isoformen nachgewiesen. Zum Untersuchungszeitpunkt der chronischen CVB3-Infektion – 56 Tage p. i. – wies die PDGF mRNA-Expression jedoch Differenzen zwischen beiden Mäusestämmen auf. Im ausgeheilten Myokard immunkompetenter C57BL/6 Mäuse war zu diesen Zeitpunkten die mRNA der untersuchten PDGF-Isoformen nur noch entsprechend dem Expressionsniveau von nicht-infizierten Kontrolltieren detektierbar. Die Expression der PDGF-Isoformen B und C war schwach bis kaum noch nachweisbar. Nur PDGF-A mRNA konnte in diesem Stadium der Infektion im Myokard von C57BL/6 Mäusen mit einem schwachen bis moderaten Expressionsniveau dokumentiert werden. In Korrelation mit der persistierenden Myokarditis im Myokard von MHC Klasse II knockout Mäusen war eine moderate Expression der mRNA der untersuchten PDGF-Isoformen auch am Tag 21 und 56 nach CVB3-Infektion feststellbar (Abb. 10).

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass eine akute CVB3-induzierte Myokarditis in beiden Mäusestämmen eine starke Expression der PDGF-Isoformen A, B und C und der Zytokine TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , IL-6 und IFN- β bewirkt. Die Beteiligung einiger dieser Faktoren am Prozess der sich ausbildenden Fibrose im Myokard von MHC Klasse II knockout Mäusen konnte vermutet werden, da zu den chronischen Zeitpunkten eine uneingeschränkte Expression dieser Faktoren nachweisbar bleibt.

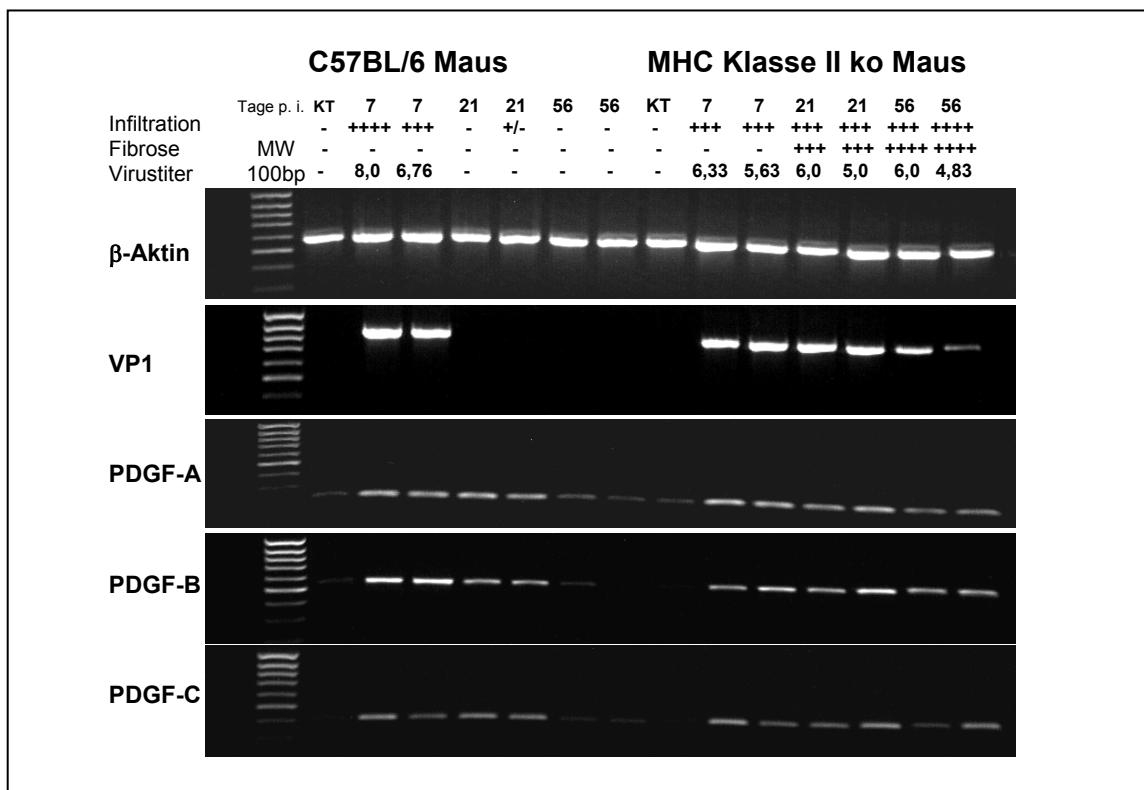


Abb. 10: Expression von PDGF-Isoformen während der CVB3-Infektion. Die Expression der mRNA von PDGF-A, -B, -C sowie von β -Aktin und des Kapsidproteins von CVB3 VP1 wurde nach einer Infektion von CVB3 nach 7, 21 und 56 Tage p. i. im Herzmuskelgewebe von MHC Klasse II ko Mäusen und C57BL/6 Mäusen untersucht und mit nicht-infizierten Kontrolltieren verglichen. Die PCR-Bedingungen waren so eingestellt, dass in nicht-infizierten Kontrollmäusen nur ein minimales Hintergrundsignal verblieb. Weiterhin sind die histologische Bewertung hinsichtlich Infiltrat und Fibrose sowie der mittels $TCID_{50}$ analysierte Virustiter im Myokard der abgebildeten Probe angegeben. (MW: Molekulargewicht; bp: Basenpaare, KT: nicht-infizierte Kontrolltiere; d: Tag; ko: knockout)

5.1.3 Zelluläre Charakterisierung der CVB3-induzierten Myokardinfiltate

Die Methode der RT-PCR gestattete eine Aussage über ein erhöhtes Expressionsniveau von verschiedenen PDGF-Isoformen im viral-entzündeten Myokardgewebe, gab aber keinen Aufschluss über die mögliche zelluläre Herkunft des jeweiligen Wachstumsfaktors im Gewebe. Eine mögliche Methode derartige Informationen zu erhalten, ist die In Situ-Hybridisierung (ISH). Der Nachweis von spezifischer mRNA direkt auf den zu untersuchenden Gewebeschnitten ist im Vergleich zur immunhistochemischen Verfahrenstechnik von Vorteil, da es in der zellulären Entwicklung oft eine signifikante zeitliche Differenz zwischen Transkription der mRNA und Translation der Proteine des zu untersuchenden Gens gibt. Weiterhin ist die Spezifität der ISH, insbesondere durch die Verwendung von sense-Sonden als Kontrolle, gegenüber der Immunhistochemie gegeben. In Paraffin eingebettete Herzgewebeschnitte von immundefizienten MHC Klasse II knockout Mäusen und immunkompetenten C57BL/6 Mäusen wurden an den Tagen 7, 21 und 56 p. i.

mittels ISH auf die mRNA-Expression von PDGF-C und des viralen Gens VP1 untersucht und mit naiven nicht-infizierten Kontrollmäusen beider Stämme verglichen.

5.1.3.1 Nachweis von PDGF-C im Myokard

Um Auskunft über die mögliche zelluläre Herkunft und die exakte Lokalisation von PDGF-C im viral induzierten Herzgewebe zu erhalten, wurde die mRNA von PDGF-C mittels einer DIG-markierten antisense-RNA-Sonde nachgewiesen. Der Vorteil der RNA-Sonde lag in ihrer hohen Sensitivität und Spezifität. Der zum Vergleich erfolgte Einsatz einer PDGF-C DIG-markierten sense-RNA-Sonde belegte die Spezifität der mit der antisense-Sonde erhaltenen Signale. Als weitere Kontrolle wurden konsekutive Gewebeschnitte ohne Gensonde behandelt. Alle abgebildeten Myokardpräparate wurden nicht gegengefärbt und mit einer 200-fachen Vergrößerung mikroskopisch aufgenommen. In Abb. 11 (C und D) ist die Expression von PDGF-C im Herzgewebe 7 Tage nach CVB3-Infektion in beiden Mäusestämmen dargestellt. Es konnten starke PDGF-C Hybridisierungssignale mit der antisense-Sonde festgestellt werden. Die Lokalisation der nachgewiesenen Signale befand sich im Bereich der Infiltrate. Infolgedessen wird vermutet, dass entweder die infiltrierenden Zellen oder die myokardialen Fibroblasten eine mögliche Quelle für die Sekretion von PDGF-C darstellen. Die Myokardschnitte, die mit der PDGF-C sense-Sonde behandelt wurden, zeigten, ebenso wie die ohne Gensonde behandelten, keine spezifischen Signale, sondern nur leichte Hintergrundsignale. Diese Kontrollen belegten die Spezifität der PDGF-C antisense-Sonde (Abb. 11). Das ISH-Bild der PDGF-C Expression änderte sich mit dem Zeitverlauf. Während in der akuten Phase der Myokarditis – 7. Tag p. i. – kein Unterschied zwischen den untersuchten Myokardproben beider Mäusestämmen nachzuweisen war, konnten an den Tagen der chronischen Phase deutliche Diskrepanzen festgestellt werden. Einhergehend mit dem Abheilen der akuten Myokarditis in immunkompetenten C57BL/6 Mäusen konnte nach 21 bzw. 56 Tagen p. i. nur ein basales Expressionsniveau von PDGF-C mRNA in den Kardiomyozyten detektiert werden (Abb. 11F und H). Dies deutet auf ein in niedriger Konzentration stetig vorhandenes endogenes PDGF-C im Myokard hin und deckt sich mit den Ergebnissen der nicht-infizierten Kontrollproben in der RT-PCR (Abb. 10). Im Gegensatz dazu war ein gleich bleibend hohes PDGF-C mRNA-Signal in den Myokardproben der MHC Klasse II knockout Mäuse am 21. und 56. Tag p. i. nachweisbar. Die Hauptlokalisierung von PDGF-C lag wiederum in den Bereichen von infiltrierenden, inflammatorischen Zellen (Abb. 11E und G).

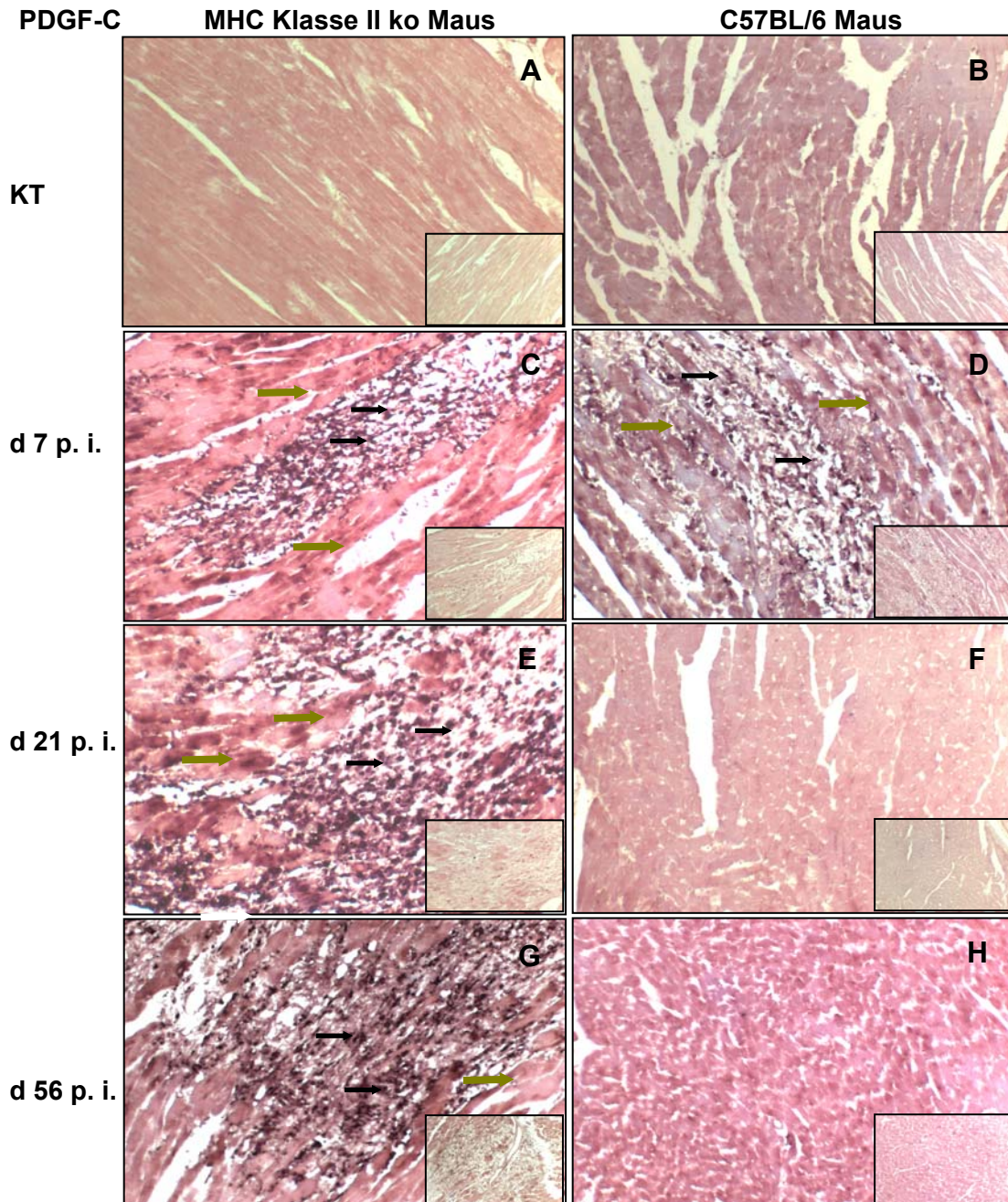


Abb. 11: In Situ-Hybridisierung (ISH) von PDGF-C mRNA im Myokard nach CVB3-Infektion. Vergleich von MHC Klasse II ko Mäusen (A, C, E und G) und C57BL/6 Mäusen (B, D, F und H). Der PDGF-C Nachweis erfolgte mit einer DIG-markierten PDGF-C antisense-RNA-Sonde, die mit einer DIG-markierten PDGF-C sense-RNA-Sonde (Negativkontrolle; kleine Abbildungen) verglichen wurde. In den Kontrolltieren (A+B) war ein Basalsignal von PDGF-C mRNA detektierbar. Starke Hybridisierungssignale von PDGF-C mRNA ließen sich am 7. d p. i. in beiden Mäusestämmen (C+D) sowie am 21. (E) und 56. (G) d p. i. im Myokard von MHC Klasse II ko Mäusen durch dunkelblau bis braun gefärbte Areale nachweisen. Sehr gut zu unterscheiden sind positive, reagierende inflammatorische Zellen (schwarze Pfeile) von weniger reaktiven Kardiomyozyten (grüne Pfeile). 21 (F) und 56 (H) d p. i. ließ sich im Myokard der C57BL/6 Mäuse kein PDGF-C mehr nachweisen. (ko: knockout, KT: Kontrolltiere; d: Tag, 200-fache Vergrößerung)

5.1.3.2 Nachweis des viralen Genoms im Gewebeschnitt

Die Detektion des CVB3-Genoms im infizierten Herzmuskelgewebe mittels ISH stellt eine Nachweismöglichkeit zur Untersuchung von Kinetik und Persistenz des viralen Agens im Myokard dar. Insbesondere die genaue Lokalität des Virusgenoms im Myokardgewebe während der Infektion kann durch diese Methode sichtbar gemacht werden. Die Verwendung einer DIG-markierten DNA-Sonde gegen das CVB3 Kapsidgen VP1 gestattete auf Grund der hohen Sensitivität nicht nur den Nachweis in der akuten Infektionsphase sondern auch die Untersuchung der persistierenden Infektion im Herzgewebe. Als Kontrolle wurden konsekutive Gewebeschnitte ohne Gensonde behandelt. Dies stellt keine sehr stringende Spezifitätskontrolle dar, jedoch konnte die Spezifität dieses Nachweises des Virusgenoms durch frühere Untersuchungen ausführlich abgeklärt werden ⁶⁶. Alle Myokardpräparate wurden mit Hämatoxylin zur besseren Darstellung gegengefärbt und mit einer 400-fachen Vergrößerung lichtmikroskopisch aufgenommen.

In Übereinstimmung mit der Virustiterbestimmung (TCID₅₀-Test) und dem VP1-Nachweis in der RT-PCR war 7 Tage p. i. die Genomsequenz für das CVB3-Kapsidgen VP1 mittels ISH im Myokardgewebe beider Mäusestämme nachweisbar (Abb. 12C und D). Die Lokalisation des CVB3-Genoms erschien als Folge der hämatogenen Infektion der Myozyten typischerweise in Gefäßnähe. Ein Unterschied in der Stärke der Infiltration und der Anzahl der viruspositiven Myozyten war zwischen beiden Mäusestämmen nicht festzustellen. Während 21 bzw. 56 Tage p. i. kein CVB3-Genom-Nachweis in immunkompetenten C57BL/6 Mäusen mehr belegbar war (Abb. 12F und H) und das Bild den dokumentierten Heilungsprozess reflektierte, zeigte sich in den untersuchten Myokardpräparaten von MHC Klasse II knockout Mäusen eine vermehrte Anzahl von viruspositiven Myozyten (Abb. 12E und G). Das persistierende Virusgenom war bevorzugt in Gebieten endomyokardialer Läsionen zu finden, was histologisch mit dem Bild einer progressiven interstitiellen Fibrose korrelierte und das Modell der chronisch manifestierten Myokarditis vervollständigte (Abb. 12E und G).

Zusammenfassend konnte festgehalten werden, dass durch ISH eine Lokalisation von PDGF-C und VP1-Genom in der akuten Phase einer CVB3-Infektion in und um die myokardialen Infiltrate gelang. Die Persistenz der PDGF-C-Signale in MHC Klasse II knockout Mäusen korrelierte mit dem Nachweis des Virusgenoms zu diesen Infektionszeitpunkten und legte einen Zusammenhang hohen Expressionssignalen von PDGF-C und anhaltender Virusinfektion im Myokard nahe.

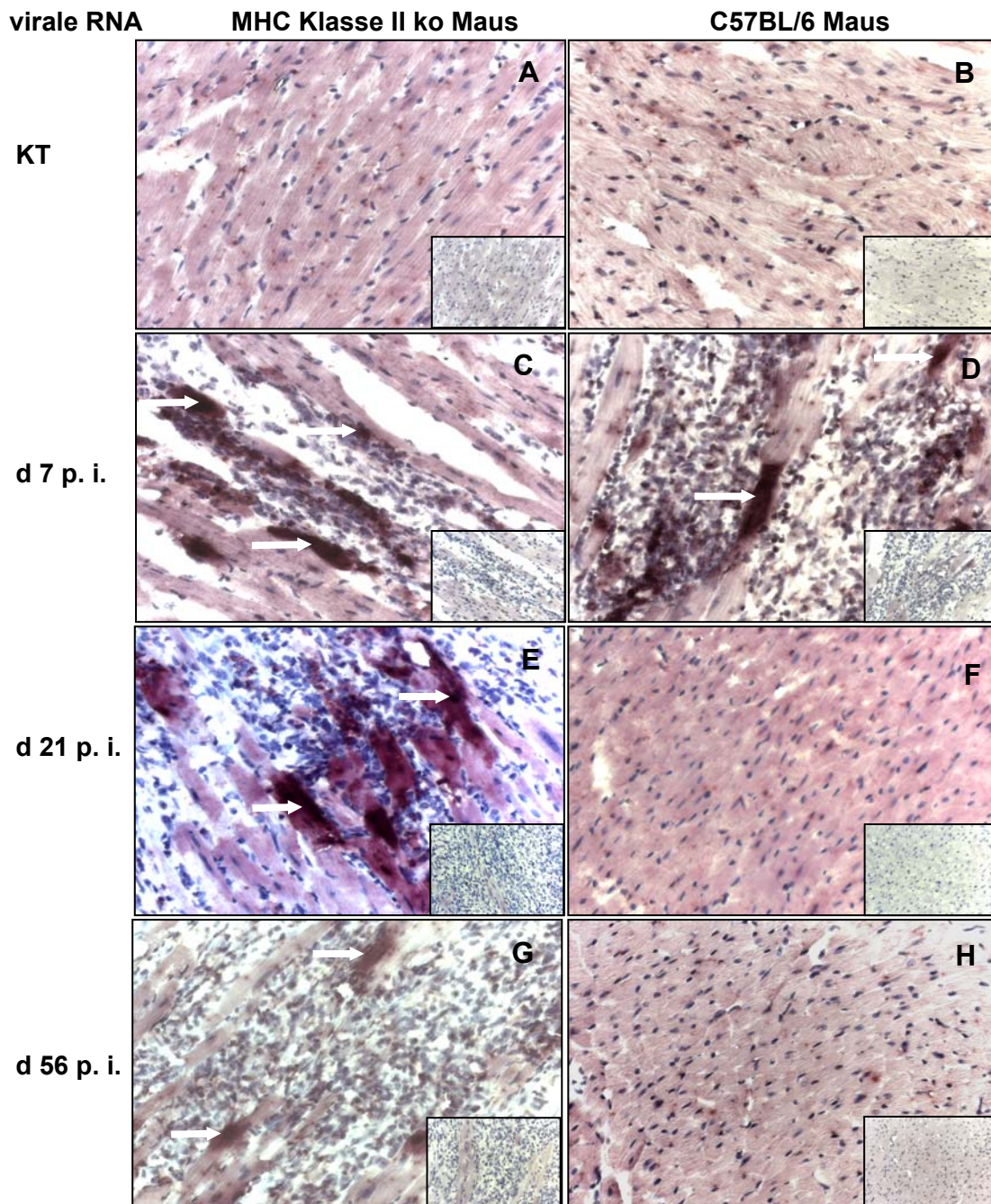


Abb. 12: In Situ-Hybridisierung (ISH) des viralen Genom im Herzmuskel nach CVB3-Infektion. Vergleich von MHC Klasse II ko Mäusen (A, C, E und G) sowie C57BL/6 Mäusen (B, D, F und H). Die Spezifität der Sonde belegen Kontrollschnitte (kleine Inserts), die keine positiven Hybridisierungssignale aufweisen. Die Kontrolltiere (**A+B**) zeigen keine positiven Signale gegen das Kapsidgen VP1. VP1-RNA ist 7 d p. i. in beiden Mäusestämmen (**C+D**) sowie am 21. (**E**) und 56. (**G**) d p. i. im Myokard von MHC Klasse II ko Mäusen durch dunkelblaue bis braune Färbung erkennbar. VP1-RNA ist hauptsächlich in Kardiomyozyten detektierbar (weiße Pfeile). Myokardpräparate von C57BL/6 Mäusen 21 (**F**) und 56 (**H**) d p. i. weisen keine Spuren einer Virusinfektion mehr auf. (Hämatoxylin-Färbung; ko: knockout, KT: Kontrolltiere; d: Tag, 400-fache Vergrößerung)

5.1.4 Immunhistochemische Untersuchung des PDGF/PDGFR-Systems im entzündeten Myokardgewebe

Unter Verwendung spezifischer Antikörper sollten in der Immunhistochemie (IHC) Informationen über zelluläre Aktivitäten des PDGF/PDGFR-Systems im Verlauf der CVB3-induzierten Myokarditis erhalten werden. Dazu wurden 10 µm Kryoschnitte des jeweiligen Myokardgewebes immunhistochemisch untersucht. Dabei war die Reaktion des entsprechenden Antikörpers mit dem spezifischen Antigen im Gewebeschnitt durch ein rotes Signal zu erkennen. Alle Präparate wurden mit Hämatoxylin gegengefärbt, so dass die Zellkerne dunkelblau und das Zytoplasma zur besseren Darstellung im Präparat hellblau erschienen. Weitergehend wurden die Präparate mit einer 200-fachen Vergrößerung mikroskopisch aufgenommen. Der Antikörper gegen das PDGF-C – der freundlicherweise von Dr. Yuan-Jang Tsai, Division of Reproduction and Endocrinology, Department of Medical Research, Mackay Memorial Hospital, Tamshui, Taiwan zur Verfügung gestellt wurde – erkannte im Myokardschnitt spezifisch ein Epitop in biologisch aktivierten PDGF-C. Die Antikörper-Antigen-Reaktion dieses Antikörpers konnte – als Negativkontrolle – mit dem zur Immunisierung verwendeten Peptid blockiert werden (Abb. 13.1C und D – kleine Inserts). Für den Nachweis der PDGF-Isoformen A und B, des PDGF α Rezeptors sowie der aktivierten Form von Akt/PKB (p-Akt) im viral entzündeten Myokardgewebe wurden käuflich erworbene Antikörper verwendet. Für diese wurde als Negativkontrolle anstelle des spezifischen Antikörpers polyklonales Kaninchen IgG (4µg/ml, Santa Cruz) auf die Myokardschnitte gegeben (exemplarisch dargestellt in Abb. 13.2C und D – kleine Inserts). Bei allen Untersuchungen wurden außerdem Negativkontrollen unter Weglassen des Primärantikörpers durchgeführt (exemplarisch gezeigt in Abb. 13.3C und D – kleine Inserts).

5.1.4.1 Nachweis von PDGF-Faktoren im Myokard während der akuten CVB3-Infektion

Positive Signale der PDGF-Isoformen (A, B und C) sind in der Abb. 13.1-13.3 dargestellt. Die Lokalisation der Antikörperfärbungen erfolgte in den massiven Infiltraten und den damit einwandernden Immunzellen im Herzgewebe (Abb. 13.1-13.3C und D). Es waren keine Unterschiede in der Stärke der nachgewiesenen Färbung zwischen beiden Mäusestämmen an diesem Infektionstag zu erkennen. Die mitgeführten Kontrollschnitte der einzelnen Myokardpräparate wiesen keine Antigen-Antikörper-Reaktion auf (Abb. 13.1-13.3C und D – kleine Inserts). Die Untersuchung des PDGF α Rezeptors zeigte ebenfalls eine spezifische Färbung im inflammatorischen Gewebe. Der Rezeptor konnte somit in unmittelbarer Nähe von PDGF-C detektiert werden (Abb. 13.1/13.4). Zusätzlich war eine spezifische Färbung von Gefäßzellen bei der Verwendung dieses Antikörpers zu beobachten. Akt/PKB ist ein Signalmolekül „stromabwärts“ von aktivierten PDGF-Rezeptoren und wird über den PI3-Kinase Weg durch den Lipidmediator Phosphatidyl-3,4,5-triphosphat (PIP3) aktiviert. Der

verwendete Antikörper erkannte selektiv aktiviertes Akt/PKB (p-Akt) und gab auf diese Weise indirekt Informationen zur Aktivierung der PDGF-Rezeptoren im entzündeten Herzgewebe (Abb. 13.5). Die nachgewiesene Antikörperfärbung am 7. Tag p. i. im entzündeten Myokard beider Mäusestämme gruppierte sich im Wesentlichen um den Bereich von infiltrierenden Immunzellen (Abb. 13.5C und D), ähnlich der nachgewiesenen Färbung des PDGF α Rezeptors (Abb. 13.4C und D).

5.1.4.2 Nachweis des PDGF/PDGFR-Systems im chronisch entzündeten Myokardgewebe

Die durch Coxsackievirus B3 verursachte akute Entzündung des Myokards heilte bis zum 21. Tag p. i. in immunkompetenten C57BL/6 Mäusen aus. Die Intensität der Färbungen für PDGF-A, -B, -C, PDGF α Rezeptors und p-Akt/PKB Antigene ging bis zu einem geringen Hintergrundsignal am 21. bzw. 56. Tag p. i. zurück und glich der nicht-infizierter naiver Kontrollmäuse (Abb. 13.1-13.5B, F und H). In immundefizienten MHC Klasse II knockout Mäusen ergab die immunhistochemische Untersuchung der PDGF-Isoformen A, B und C am 21. und 56. Tag p. i. jedoch weiterhin intensive Färbungen, die vor allem in Regionen mit massiven immunzellulären Infiltraten zu erkennen waren (Abb. 13.1-13.3E und G). Diese Ergebnisse glichen dem am 7. Tag p. i. erhaltenem Muster und bestätigten die Expressionsmuster der RT-PCR sowie – für PDGF-C – die Ergebnisse der ISH. Ebenso konnte in den chronischen Infektionsphasen im Myokardgewebe von MHC II knockout Mäusen der PDGF α Rezeptor nachgewiesen werden (Abb. 13.4E und G). Dieser befand sich bevorzugt in Regionen von Inflammation und Fibrose. Die spezifische Färbung war nicht nur in Kardiomyozyten vorzufinden, ebenso konnte der PDGF α Rezeptor in kleinen Zellen außerhalb der inflammatorischen Reaktion detektiert werden. Die Färbung von aktiviertem Akt/PKB wurde in der Nähe der PDGFR- α Färbung lokalisiert und könnte die Folge einer Aktivierung von PDGFR- α in den residenten Herzzellen sein (Abb. 13.5E und G).

Zusammenfassend war festzustellen, dass im Gewebe von immunkompetenten und immundefizienten Mäusen zum Zeitpunkt der akuten Myokarditis kein Unterschied in der Expression der PDGF-Isoformen, des PDGFR- α und der Aktivierung von Akt/PKB feststellbar war. Die Lokalisation erfolgte hauptsächlich in Bereichen der Entzündungsherde. Einhergehend mit dem Abheilen der akuten Myokarditis war ein Rückgang der Farbsignale der untersuchten Antikörper im Myokard von C57BL/6 Mäusen feststellbar. Dagegen nahm die zelluläre Zerstörung des Herzmuskels in den immundefizienten MHC Klasse II knockout Mäusen zum späten Zeitpunkt der CVB3-Infektion weiter zu, besonders in Arealen der Infiltrate konnte eine unveränderte Detektion von PDGF- und PDGFR-positiven Zellen detektiert werden.

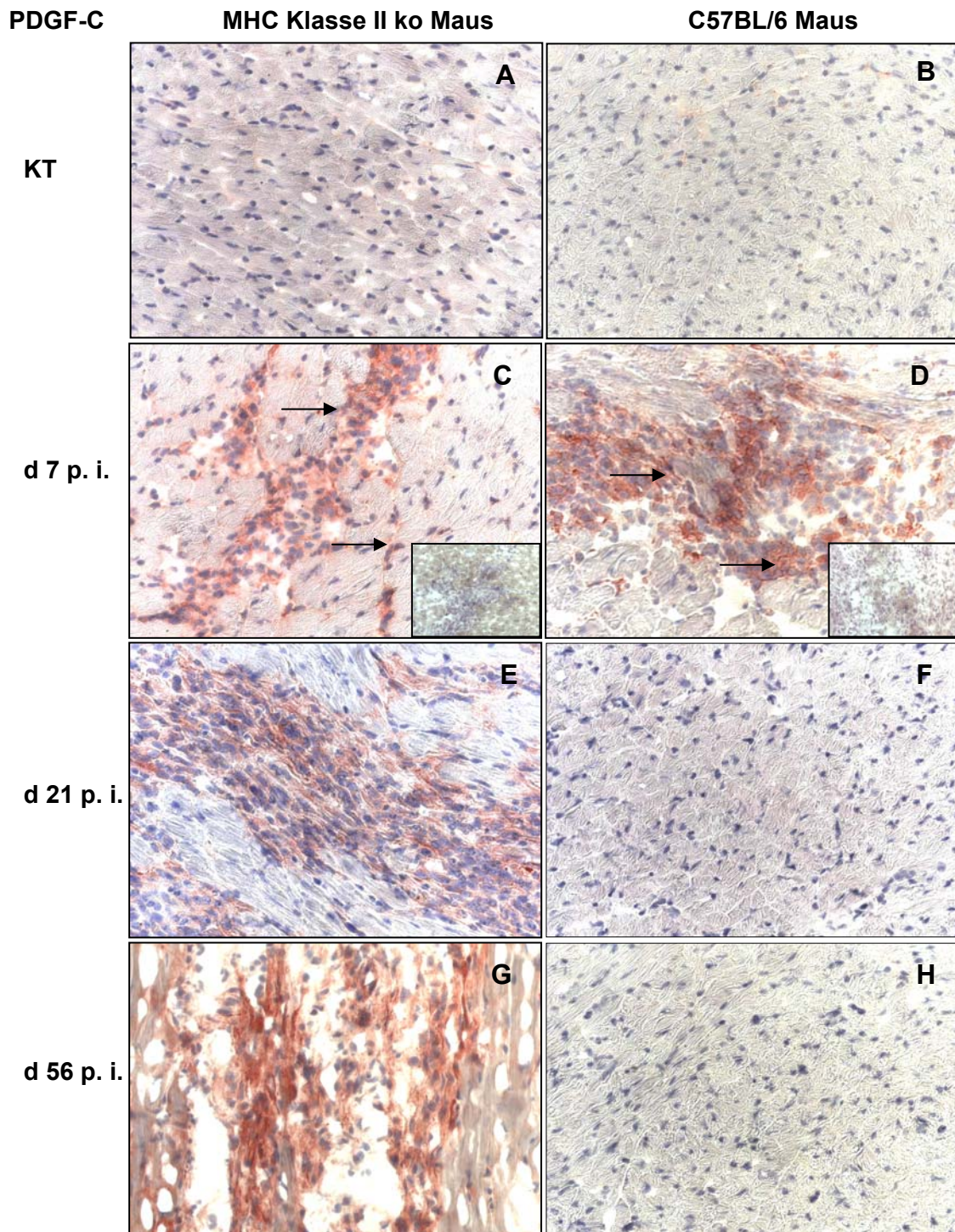


Abb. 13.1: Befunde der IHC-Untersuchung von PDGF-C im myokardialen Infiltrat nach Infektion mit CVB3. Dargestellt sind Kryoschnitte von MHC Klasse II ko Mäusen (A, C, E und G) und C57BL/6 Mäusen (B, D, F und H), 7 (C+D), 21 (E+F) sowie 56 (H+G) d p. i., im Vergleich zu nicht-infizierten Kontrolltieren (A+B). Durch schwarze Pfeile sind PDGF-C immunreaktive Zellen gekennzeichnet, die sich in inflammatorischen Regionen und außerhalb des Infiltrates anfärben ließen. Die in C und D dargestellten Inserts zeigen Negativkontrollen unter Verwendung des zur Blockierung der Antikörperreaktion eingesetzten Peptids. (Hämatoxylin-Färbung; ko: knockout; KT: Kontrolltiere; d: Tag; 200-fache Vergrößerung)

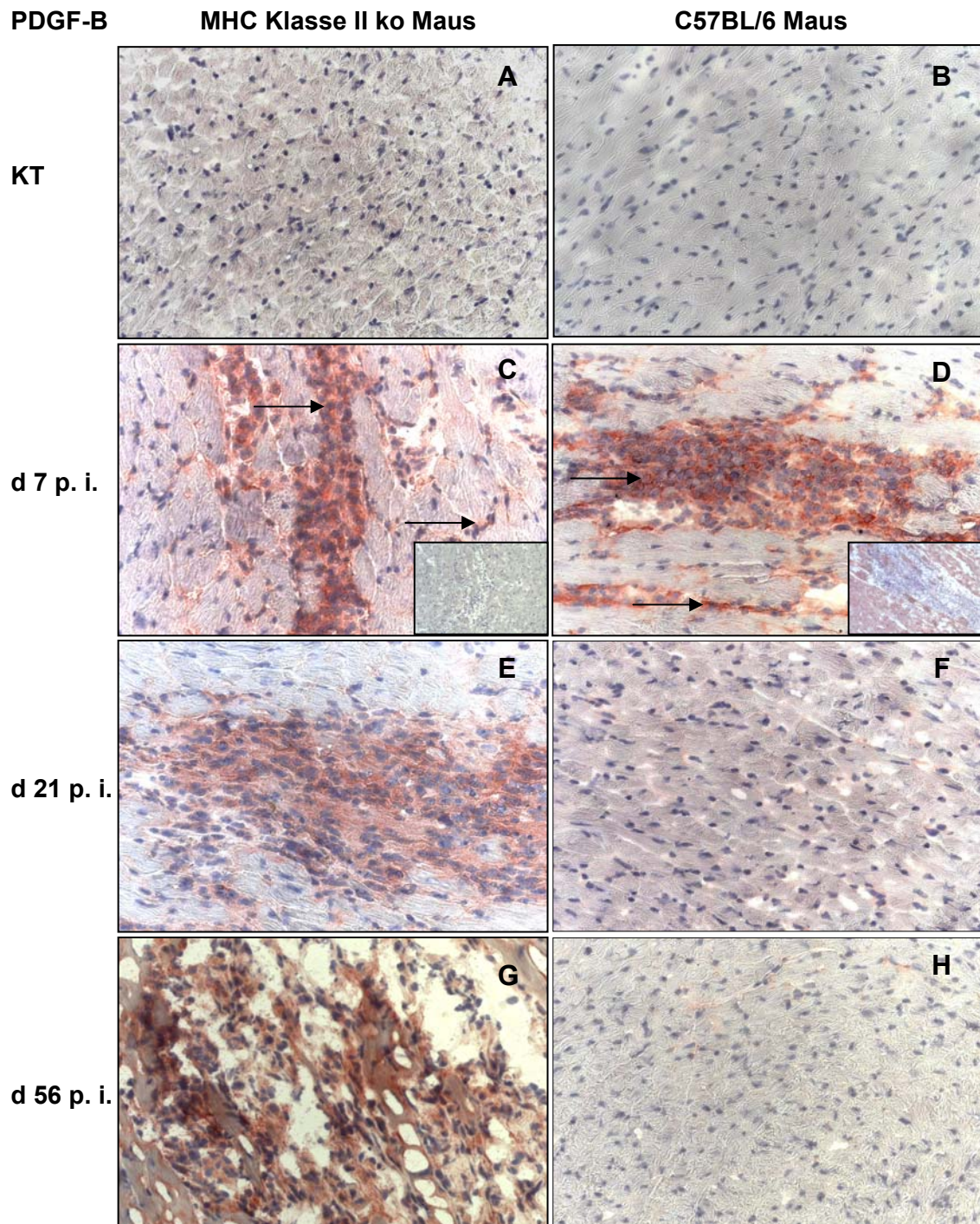


Abb. 13.2: IHC-Detektion von PDGF-B im Herzgewebe nach CVB3-Infektion. Vergleich von MHC Klasse II ko Mäusen (A, C, E und G) und C57BL/6 Mäusen (B, D, F und H) an den Untersuchungstagen 7 (C+D), 21 (E+F) sowie 56 (H+G) d p. i. Am 7. d p. i. konnte in und um das Infiltrat von beiden Mäusestämmen PDGF-B detektiert werden (C+D) (schwarze Pfeile). Die Anfärbung von PDGF-B immunreaktiven Zellen gelang nur bei einer Persistenz des myokardialen Infiltrates in MHC Klasse II ko Mäusen (E+G). Die abgebildeten Inserts in C und D zeigen konsekutive Kontrollschnitte unter Verwendung von Kaninchen IgG anstelle des primären Antikörpers. (Hämatoxylin-Färbung; ko: knockout; KT: Kontrolltiere; d: Tag; 200-fache Vergrößerung)

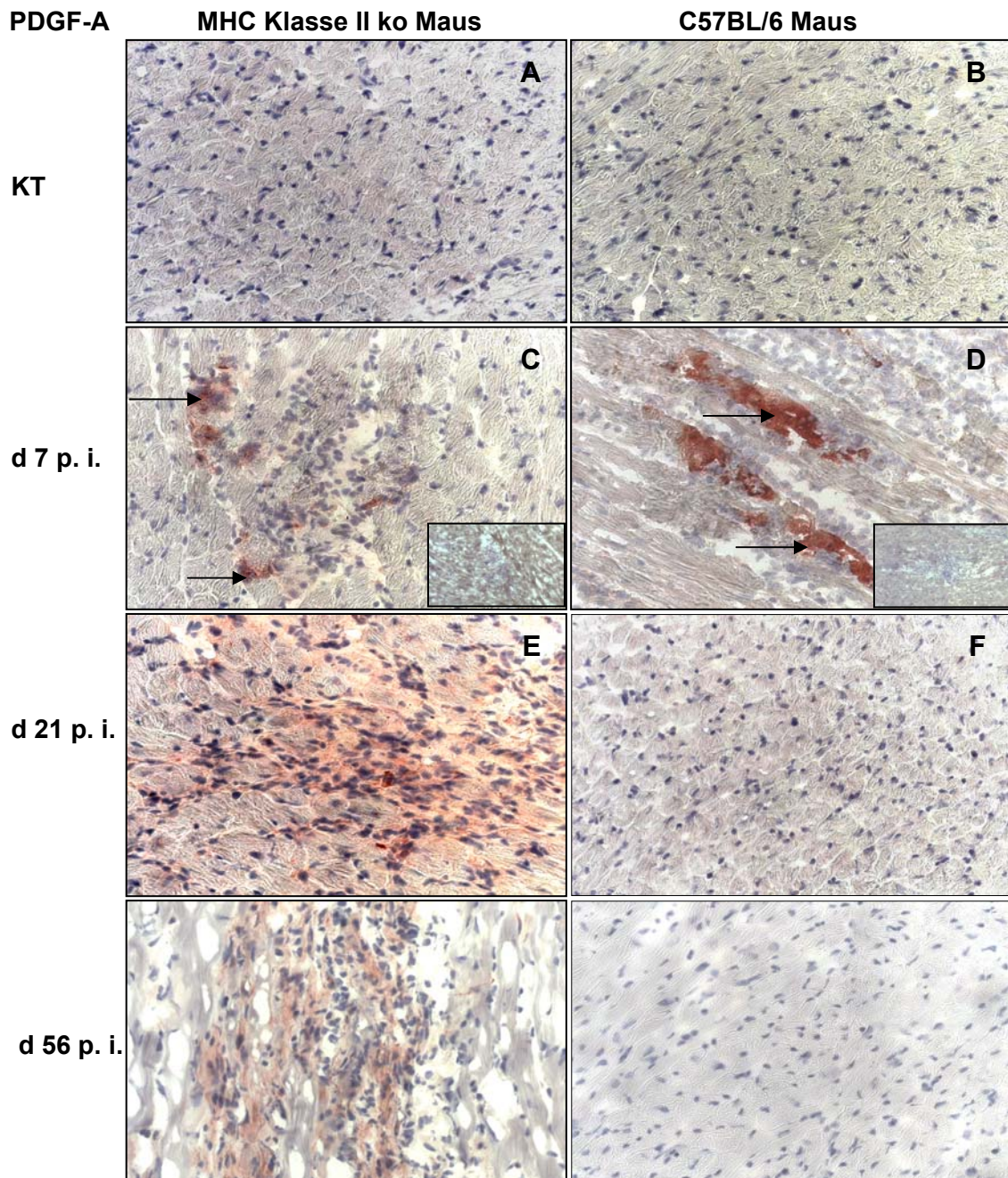


Abb. 13.3: IHC-Nachweis von PDGF-A im Myokard nach Infektion mit CVB3. Kryoschnitten von MHC Klasse II ko Mäusen (A, C, E und G) und C57BL/6 Mäusen (B, D, F und H) am 7. (**C+D**), 21. (**E+F**) und 56. (**G+H**) d p. i. im Vergleich zu nicht-infizierten Kontrolltieren (**A+B**). PDGF-A konnte in der akuten Phase in und um das entzündliche Infiltrat in beiden Mäusestämmen (C+D) (schwarze Pfeile) sowie im Myokard von MHC Klasse II ko Mäusen an den beiden chronischen Zeitpunkten, 21. (E) und 56. d p. i. (G) dokumentiert werden. Die abgebildeten Inserts in C und D stellen konsekutive Negativkontrollen unter Verwendung von PBS anstelle des Primärantikörpers dar. (Hämatoxylin-Färbung; ko: knockout; KT: Kontrolltiere; d: Tag; 200-fache Vergrößerung)

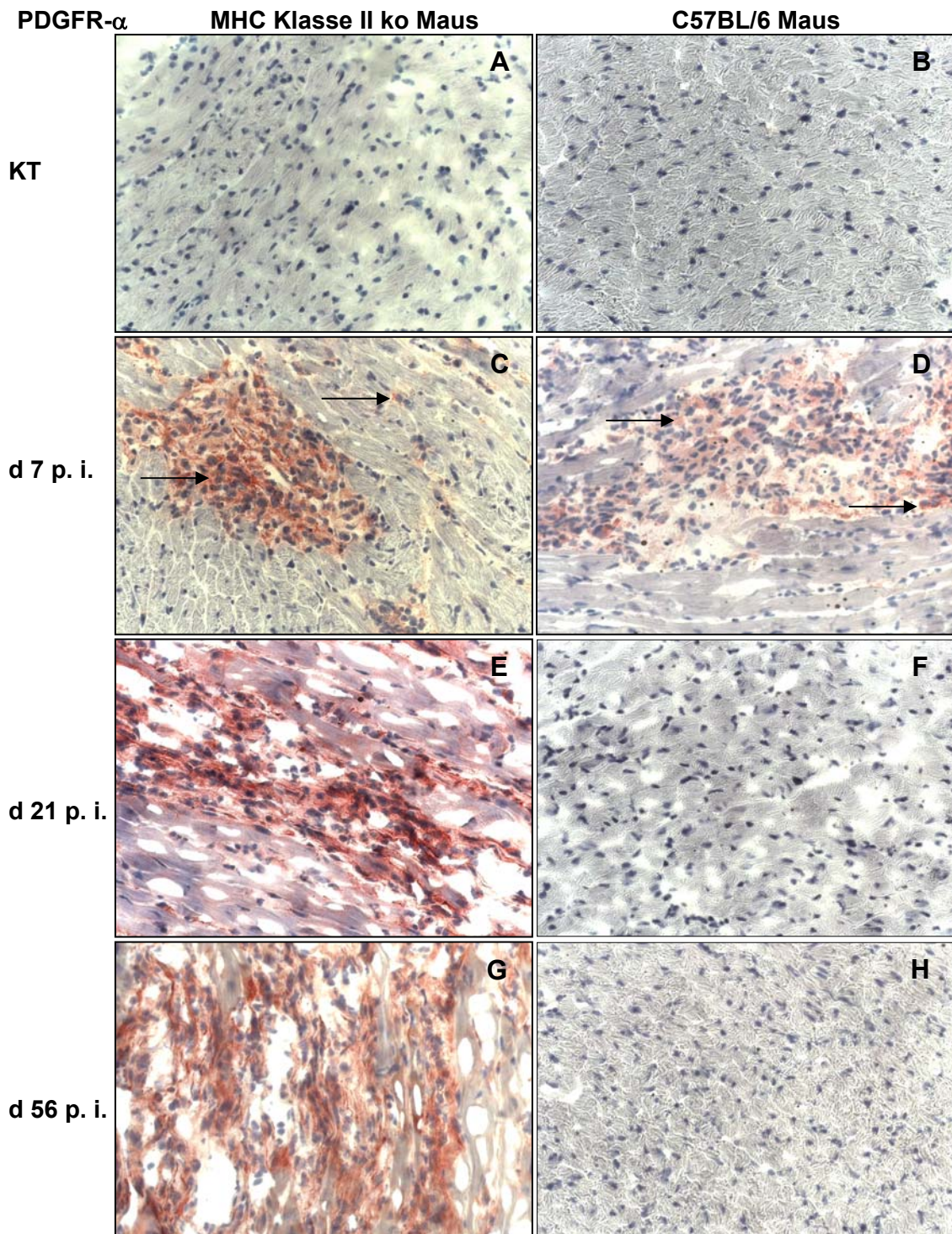


Abb. 13.4: Befunde der IHC-Untersuchung von PDGFR- α im Myokard nach CVB3-Infektion. Vergleich von MHC Klasse II ko Mäusen (A, C, E und G) und C57BL/6 Mäusen (B, D, F und H) am 7. (C+D), 21. (E+F) und 56. (G+H) d p. i. zu nicht-infizierten Kontrolltieren (A+B). Der PDGF- α Rezeptor war nicht nur in infizierten Kardiomyozyten präsent, sondern auch in kleinen Zellen in und um die Myokardläsionen (C+D) (schwarze Pfeile) sowie im persistent infizierten Myokard von MHC Klasse II ko Mäusen am 21. (E) und 56. (G) d p. i. (Hämatoxylin-Färbung; ko: knockout; KT: Kontrolltiere; d: Tag; 200-fache Vergrößerung)

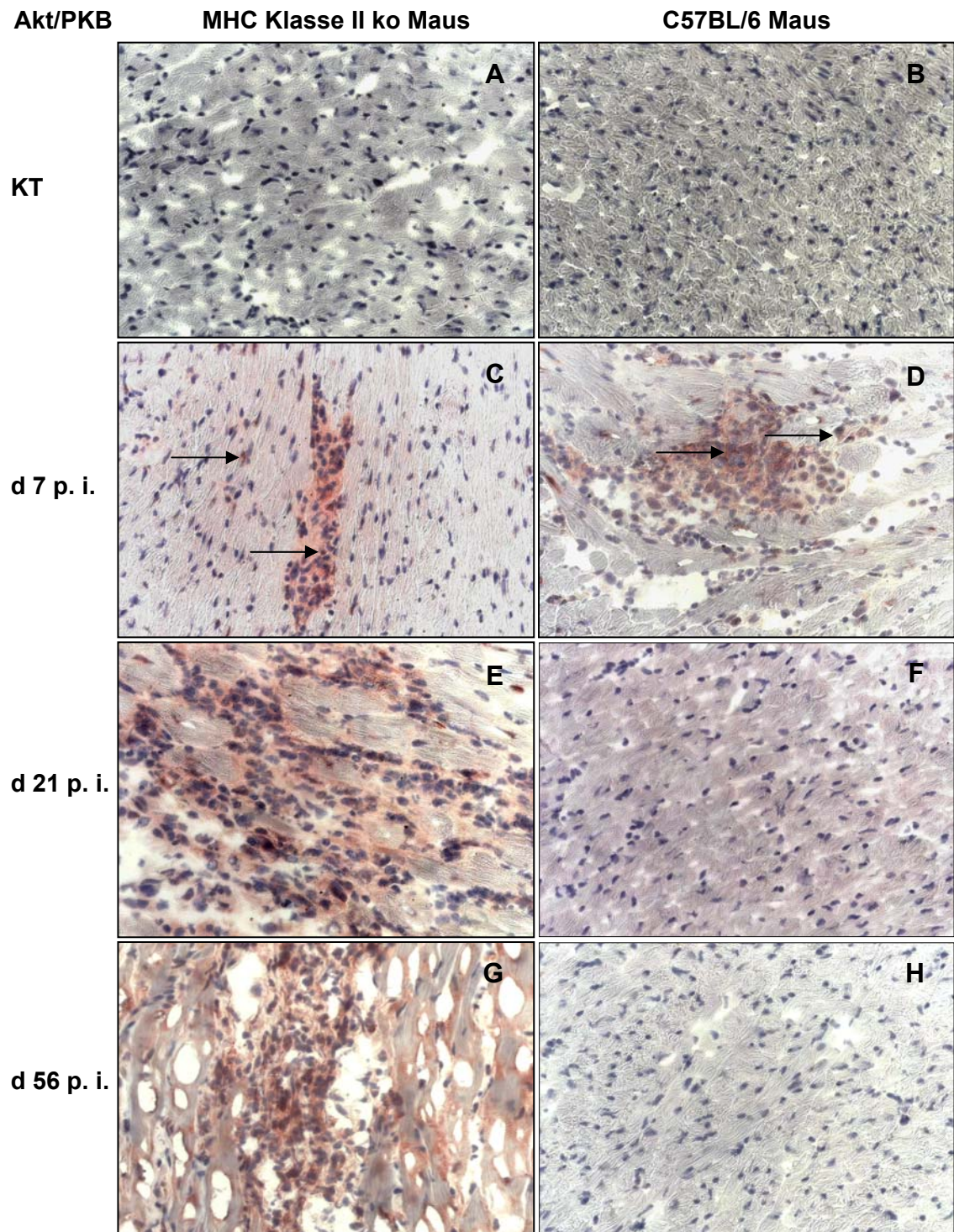


Abb. 13.5: IHC-Detektion von aktiviertem Akt/PKB (p-Akt) im CVB3-infizierten Myokard. Kryoschnitte von MHC Klasse II ko Mäusen (A, C, E und G) und C57BL/6 Mäusen (B, D, F und H). Während am 7. d p. i. in beiden Mäusestämmen im Infiltrat eine immunohistochemische Färbung von p-Akt gelang (C+D) (schwarze Pfeile), konnte diese 21 (E) bzw. 56 (G) d p. i. nur noch im Infiltrat von MHC Klasse II ko Mäusen nachgewiesen werden. Myokardpräparate von C57BL/6 Mäusen zeigten zu diesen Zeitpunkten keine Antigen-Antikörper-Reaktionen mehr (D+F) und ähnelten den Myokardschnitten von nicht-infizierten Kontrolltieren (A+B). (Hämatoxylin-Färbung; ko: knockout; KT: Kontrolltiere; d: Tag; 200-fache Vergrößerung)

5.1.5 Analyse von gesteigerter PDGF-Aktivität im CVB3-infizierten Myokard

Die bisher beschriebenen mRNA-Expressionsnachweise und immunistochemische Analysen belegten die erhöhte Expression von PDGF-Isoformen im CVB3-infizierten Myokardgewebe, gaben jedoch nicht direkt Auskunft über ihre Aktivierung. Als Möglichkeit, die erhöhte Aktivität von PDGF-Faktoren im CVB3-infizierten Herzmuskelgewebe nachzuweisen, erschien die Extraktion der Faktoren und der Nachweis ihrer Aktivität an kultivierten Fibroblasten *in vitro*. Fibroblasten besitzen durch das Vorhandensein beider PDGF-Rezeptoren – PDGFR- α und PDGFR- β – die Fähigkeit alle PDGF-Liganden zu binden. Die Rezeptor-Aktivierung kann mittels SDS-PAGE und Immunblot unter Verwendung eines Anti-Phosphotyrosin-Antikörpers (4G-10) dargestellt werden.

Myokardgewebe von MHC Klasse II knockout Mäusen und C57BL/6 Wildtypmäusen wurde am 7., 21. und 56. Tag nach CVB3-Infektion in einer PBS-haltigen Lösung homogenisiert und der erhaltende Extrakt oder entsprechendes Kontrollmedium wurde auf konfluent gewachsene Swiss 3T3 Fibroblasten gegeben. Zum Vergleich und zur Standardisierung wurden die Zellen unter denselben Bedingungen mit verschiedenen Konzentrationen (1,0; 2,5 oder 5,0 ng/ml) PDGF-BB inkubiert. PDGF-BB bindet an beide PDGFR-Isoformen gleichermaßen gut. Die Fibroblasten wurden lysiert und die Zellüberstände für SDS-PAGE und Immunblot aufgearbeitet. Die entstandenen Banden wurden densitometrisch ausgewertet. In Abb. 14 sind ein repräsentativer Immunblot mit der PDGFR- α/β -Bande (185 kDa) und die graphische Darstellung der quantifizierten Banden aus 9 Experimenten dargestellt. Die Analyse zeigte, dass im CVB3-infizierten Myokard beider Mäusestämmen potentiell ein erhöhter Spiegel von aktiviertem-PDGF im Vergleich zu nicht-infizierten Kontrolltieren vorhanden ist. Da jedoch bei dieser Untersuchungsmethode mit der eingesetzten Menge an Herzgewebe die Nachweisgrenze erreicht war und die Signale sehr stark schwankten, kann über signifikante Unterschiede zwischen beiden Mäusestämmen oder über einen Anstieg oder Abfall der Expression zu späteren Infektionszeitpunkten – 21 und 56 Tage p. i. – aus diesen Daten keine Aussagen getroffen werden.

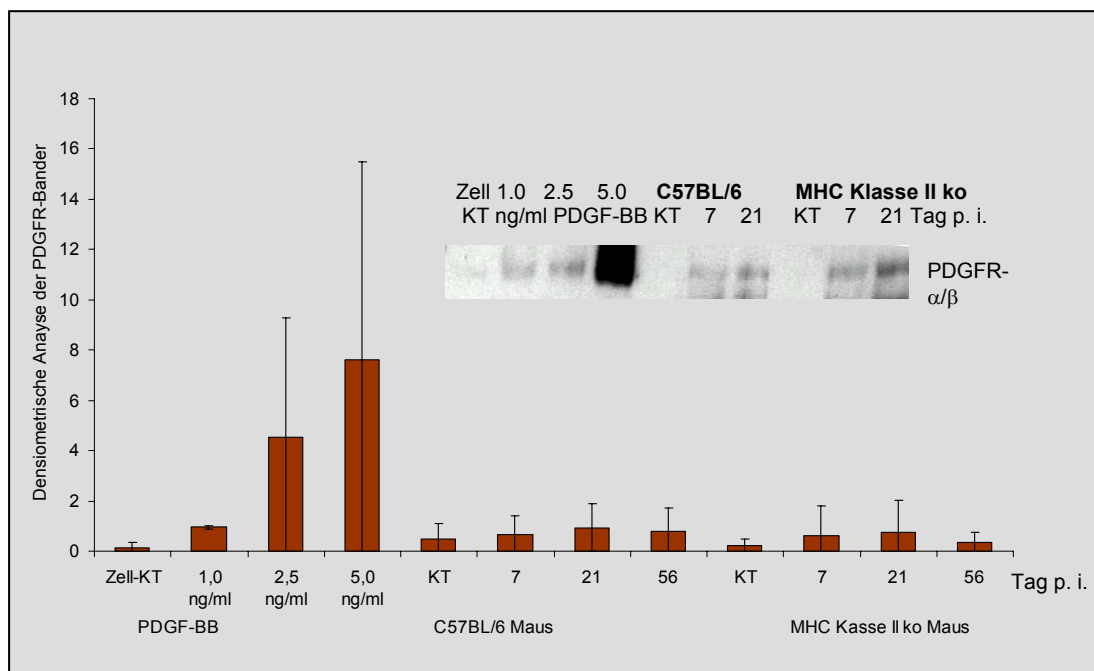


Abb. 14: Testung von Herzgewebe-Extrakten auf den Gehalt an PDGF durch Aktivierung von PDGF-Rezeptoren in Swiss 3T3 Fibroblasten *in vitro*. Konfluente Swiss 3T3 Fibroblasten wurden mit einem serumfreien Medium, in dem entweder die angegebene PDGF-BB Konzentration enthalten war oder mit PBS-haltigen Myokardextrakten von nicht-infizierten oder CVB3-infizierten MHC Klasse II ko Mäusen und C57BL/6 Mäusen (7, 21 und 56 d nach CVB3-Infektion) inkubiert. Die Zellen wurden lysiert und auf PDGFR-Phosphorylierung durch einen Immunblot mit Anti-Phosphotyrosin-Antikörper analysiert. Die Immunblots wurden über eine densitometrische Analyse quantifiziert. Die angegebenen Werte sind relativ, in dem die mit 1 ng/ml PDGF-BB erhaltenen Signale mit 1,0 angegeben sind. Die Abb. zeigt die graphische Darstellung und Zusammenfassung der Mittelwerte und Standardabweichung aller analysierten Myokardproben sowie ein Immunblot als Beispiel. (Zell-KT: 3T3-Zellkontrolle; KT: Kontrolltiere; ko: knockout)

5.2 PDGF-Rezeptoren als mögliches Target zur Verringerung einer CVB3-induzierten Fibrosierung des Myokards

Die in Teil 1 der Arbeit dargelegten Ergebnisse legen eine gesteigerte Aktivierung des PDGF/PDGFR-Systems im Prozess der myokardialen Fibrosierung, ausgelöst durch eine CVB3-Infektion, nahe. Mit den Methoden der semiquantitativen RT-PCR, der In Situ-Hybridisierung und der Immunhistochemie konnte dokumentiert werden, dass ein lokal erhöhter PDGF-Spiegel mit erhöhter Bindegewebsvermehrung im Myokard einherging. Die denkbare kausale Beteiligung des PDGF/PDGFR-Systems an der Entwicklung von Myokardfibrose sollte im zweiten Teil der Arbeit durch den Einsatz von Inhibitoren für die PDGF-Rezeptor Signaltransduktion geprüft werden. Eine pharmakologisch aussichtsreiche Strategie stellt dabei die direkte Blockade der enzymatischen Aktivität der PDGFR-Kinase dar. Ein potenter und funktionsfähiger Blocker der PDGFR-Kinase ist die von Novartis-Pharma entwickelte Verbindung STI571 (CGP57148B) – Glivec.

Um den Effekt dieser Substanz auf die Fibrosierung des Myokard zu prüfen, wurden MHC Klasse II knockout Mäuse mit CVB3-Mü/J infiziert und 2x täglich über die orale Applikationsroute mit STI571 behandelt. Als Kontrollgruppen dienten parallel mitgeführte MHC Klasse II knockout Mäuse, die mit CVB3-infiziert wurden und eine Vergleichslösung (Aqua dest.) appliziert bekamen, sowie scheininfizierte Mäuse, denen entweder die STI571 Dosis oder eine Vergleichslösung verabreicht wurden.

5.2.1 Bioverfügbarkeit und Effizienz von STI571 im Myokardgewebe

Grundlage für eine effiziente Behandlung mit dem PDGFR-Blocker STI571 ist eine genügend hohe Konzentration des Hemmstoffes im Zielorgan. Eine weitere Voraussetzung ist die Verträglichkeit des Medikaments in der gewünschten Dosis.

5.2.1.1 STI571-Konzentrationen im Myokardgewebe

Zur Klärung der Frage, ob eine ausreichende STI571-Konzentration im Myokard erreicht werden kann, wurde STI571 in zwei verschiedenen Konzentrationen – 50 und 150 mg/kg Körpergewicht – über einen Zeitraum von 1 bis 3 Tagen an MHC Klasse II knockout Mäuse verabreicht. Die STI571-Konzentration im Myokardgewebe wurde analysiert, indem das Gewebe gemäß einer von NOVARTIS vorgegebenen Methode (Herzgewebe-Extraktion zur Analyse von STI571(Glivec)) aufgearbeitet wurde. Die Konzentration des aus dem Myokardgewebe extrahierten STI571 wurde freundlicher Weise von Dr. Gilles-Jaques Riviere (NOVARTIS Pharma, Rueil-Malmaison, Frankreich) mittels HPLC bestimmt. Die gemessenen Rohdaten sind in Tab. 5 und 12 (im Anhang) dargestellt. Zu erkennen ist, dass eine orale Applikation von STI571 ausreichte, um eine messbare Akkumulation dieser Substanz im Herzgewebe zu erreichen. Diese war abhängig von der Dauer der Applikation und der verabreichten Dosis. Im Vergleich zu scheininfiziertem Herzgewebe waren die STI571-Anreicherungen im CVB3-infiziertem Herzgewebe offenbar erhöht. Da wegen der Gruppeneinteilung und des begrenzten Myokardmaterials nur jeweils 2 Stichproben genommen werden konnte, ließ die entsprechend niedrige Versuchstieranzahl keine Berechnung von Signifikanzen zu. Gleichwohl wird deutlich, dass, im Vergleich zu einer Behandlung mit 50 mg/kg STI571, bei einer Behandlung mit 150 mg/kg STI571 eine höhere Konzentration im Myokardgewebe messbar war. Ebenso führte eine Behandlung über einen Zeitraum von 2-3 Tagen, gleich welcher Dosis, zu einer höheren STI571 Akkumulation im Zielorgan. Der IC_{50} -Wert von Glivec für die Inhibition der PDGFR-Tyrosinkinase *in vitro* liegt bei $0,1 \mu M$ ¹⁷⁶ und wurde bei der Applikationsdauer von 3 Tagen in allen Fällen deutlich überschritten.

Tab. 5: STI571-Konzentrationen im Herzgewebe von CVB3-infizierten und scheininfizierten MHC Klasse II knockout Mäusen. Die vollständige Tabelle (Tab. 12), mit allen erstellten Daten befindet sich im Anhang. Dargestellt ist neben der Behandlungsdauer und der verabreichten STI571 Dosis die Berechnung der vorliegenden STI571 Konzentration im Herzgewebe.

Herzgewebe von scheininfizierten /CVB3-infizierten Mäusen	Behandlung mit STI571	Tage der Behandlung	Konzentration von STI571 im Herzextrakt; [ng/ml]	Konzentration von STI571 im Herzgewebe; [ng/ml] ($\times 10^{-2}$)	Konzentration von STI571 im Herzgewebe; [μ Mol/l]
scheininfiziert	50 mg/kg	1	11,5	1,29	0,22
CVB3-infiziert 8. d p. i.	50 mg/kg	1	99,0	2,47	0,42
scheininfiziert	50 mg/kg	3	48	5,40	0,92
CVB3-infiziert 10. d p. i.	50 mg/kg	3	535	13,37	2,27
scheininfiziert	150 mg/kg	1	75,3	8,47	1,44
CVB3-infiziert 8. d p. i.	150 mg/kg	1	693	17,32	2,94
scheininfiziert	150 mg/kg	3	824	92,70	15,60
CVB3-infiziert 10. d p. i.	150 mg/kg	3	1810	45,25	7,67

5.2.1.2 Toxizität und Nebenwirkungen der STI571-Behandlung

Um toxische Eigenschaften und mögliche Nebenwirkungen im murinen Myokard, ausgelöst durch eine STI571 Behandlung, zu untersuchen, wurden MHC Klasse II knockout Mäuse mit CVB3-Mü/J infiziert und 20 Tage 2x täglich oral mit 50, 100 und 150 mg/kg STI571 behandelt und das Körpergewicht gemessen. In Abb. 15 sind die Gewichtsverluste der einzelnen Gruppen in Bezug auf das Ausgangsgewicht der Mäuse in Gramm dargestellt. Bei Mäusen, die mit 150 mg/kg STI571 über einen Zeitraum von mehr als 7 Tagen behandelt wurden, traten Gewichtsverluste auf, die binnen einer Woche zwischen 5 und 9 Gramm betragen. Da aus diesem Grund mit einer hohen Absterberate im Infektionsversuch gerechnet werden musste, wurde der Versuch am 9. Tag abgebrochen. Die gewonnenen Ergebnisse dokumentierten, dass eine Behandlung mit 150 mg/kg STI571 zwar zu einer nachweisbar hohen Dosis von STI571 im Myokard führte, die genannte Behandlung jedoch zu toxisch auf die Mäuse wirkte. Dagegen vermochte die oral applizierte Dosis von 50 mg/kg STI571 eine bereits ausreichende Konzentration im Herzgewebe zu erzielen und war darüber hinaus für die behandelten Mäuse gut verträglich. Die Verwendung einer intermediären Behandlungsdosis von 100 mg/kg STI571 zeigte ebenfalls eine gute Verträglichkeit für die behandelten Mäuse (Abb. 15).

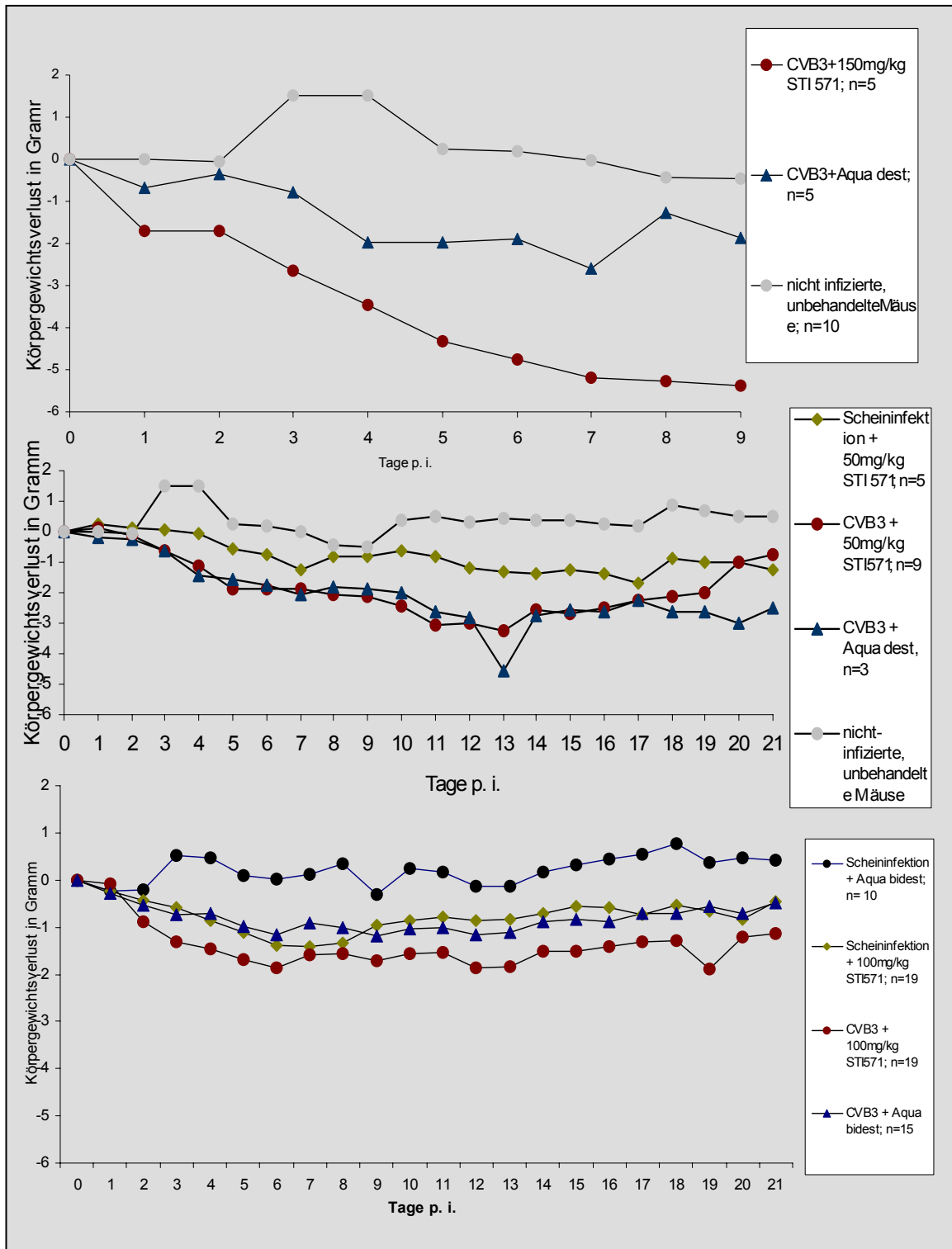


Abb. 15: Entwicklung und Änderung des Körpergewichtes von CVB3-infizierten MHC Klasse II ko Mäusen unter Behandlung mit 150 mg/kg, 50 mg/kg und 100 mg/kg STI571. Als Vergleich dienten CVB3-infizierte und mit Vergleichslösung behandelte Mäuse sowie scheininfizierte Mäuse, die mit STI571 (für 50 bzw. 100 mg/kg) behandelt wurden. Des Weiteren ist eine Gruppe von naiven, nicht-infizierten und unbehandelten Kontrollmäusen aufgeführt. Diese Gruppe wurde einmal untersucht und als Kontrolle für alle weiteren Experimente verwandt.

5.2.2 Effekte der STI571-Wirkstoffbehandlung auf die Aktivität des PDGF/PDGFR-Systems

Um die Wirksamkeit der STI571-Behandlung auf die Aktivität des PDGF/PDGFR-Systems direkt zu prüfen, wurden MHC Klasse II knockout Mäuse mit CVB3-Mü/J infiziert und 2x täglich oral, von Tag 1 bis 6 p. i., mit STI571 behandelt. Das Myokardgewebe wurde extrahiert und PDGF-Rezeptoren wurden durch Rezeptor-spezifische Immunpräzipitation isoliert (siehe Methode: Detektion von PDGFR-Aktivierung mittels Immunpräzipitation). Als Ladekontrolle wurde in den Lysaten ein Vinculinnachweis durchgeführt. Die technische Qualität dieser Experimente war nicht zufrieden stellend. Der biochemische Nachweis von aktivierten PDGF-Rezeptoren im Gewebe mit relativ geringem endogenem Spiegel ist generell schwierig¹⁹⁹. Im Myokardgewebe von CVB3-infizierten MHC Klasse II knockout Mäusen war zum Zeitpunkt der akuten Infektion – 7. Tag p. i. – im Vergleich zu scheininfizierten Mäusen, ein stärkeres Signal von phosphorylierten PDGF-Rezeptor nachweisbar (Abb. 16). Die Zugabe von exogenen PDGF-BB zu den scheininfizierten Myokardproben bewirkte die Phosphorylierung der immunpräzipitierten PDGFR, die somit detektierte Bande war in einem verstärkten Niveau nachweisbar. Dagegen erzielte die zusätzliche Gabe von PDGF-BB zu CVB3-infizierten Myokardproben keine verstärkte Signalgebung des phosphorylierten PDGFR. Durch die orale Applikation des Tyrosin-Kinase-Hemmers STI571 in CVB3-infizierte Mäuse war eine deutliche Inhibierung der PDGFR-Phosphorylierung im Myokardgewebe bestimmbar, die auch durch Zugabe von PDGF-BB nicht reaktiviert werden konnte (Abb. 16).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass trotz erheblicher Variabilität und dem relativ niedrigen Anteil der PDGF-Rezeptoren in den Myokardproben ein verstärktes PDGFR-Phosphorylierungssignal in der Mehrheit der CVB3-infizierten Myokardproben vorgefunden wurde. Mit STI571 war es möglich, der PDGFR-Phosphorylierung im viral entzündeten Herzgewebe entgegen zu wirken.

in den jeweiligen Experimenten erstellen zu können, wurden die verwendeten Mäuse aus den einzelnen Behandlungsgruppen vereint.

5.2.3.1 Einfluss der STI571-Behandlung auf CVB3-Infektion

Die Ausbildung einer massiven myokardialen Fibrose mit destruktiver Veränderung des Myokards geht in diesem Mausmodell mit einer Persistenz des Coxsackievirus B3 einher. Um auszuschließen, dass eine Behandlung mit STI571 einen Einfluss auf die CVB3 Replikation im Myokard von MHC Klasse II knockout Mäusen ausübt und somit den Krankheitsverlauf unerwartet verändert, wurde der Virustiter am 21. Tag p. i. mittels TCID₅₀ untersucht. Im Herzmuskelgewebe von Scheininfizierten Mäusen mit oder ohne STI571 Behandlung waren keine replizierenden Viren detektierbar. Der ermittelte Virustiter von CVB3-infizierten Mäusen, behandelt mit STI571 oder einer Vergleichslösung am 21. Tag p. i., zeigte keinen Unterschied (Abb. 17). Die Viruslast war in uneingeschränkter Höhe nachweisbar. Parallel zur Bestimmung des Virustiters im Myokard wurden die Organe Pankreas und Milz auf replizierendes Coxsackievirus B3 untersucht. In CVB3-infizierten Mäusen von beiden Versuchsgruppen, behandelt mit STI571 oder Vergleichslösung war 21 Tage p. i. in diesen Organen kein replizierendes Virus mehr nachweisbar.

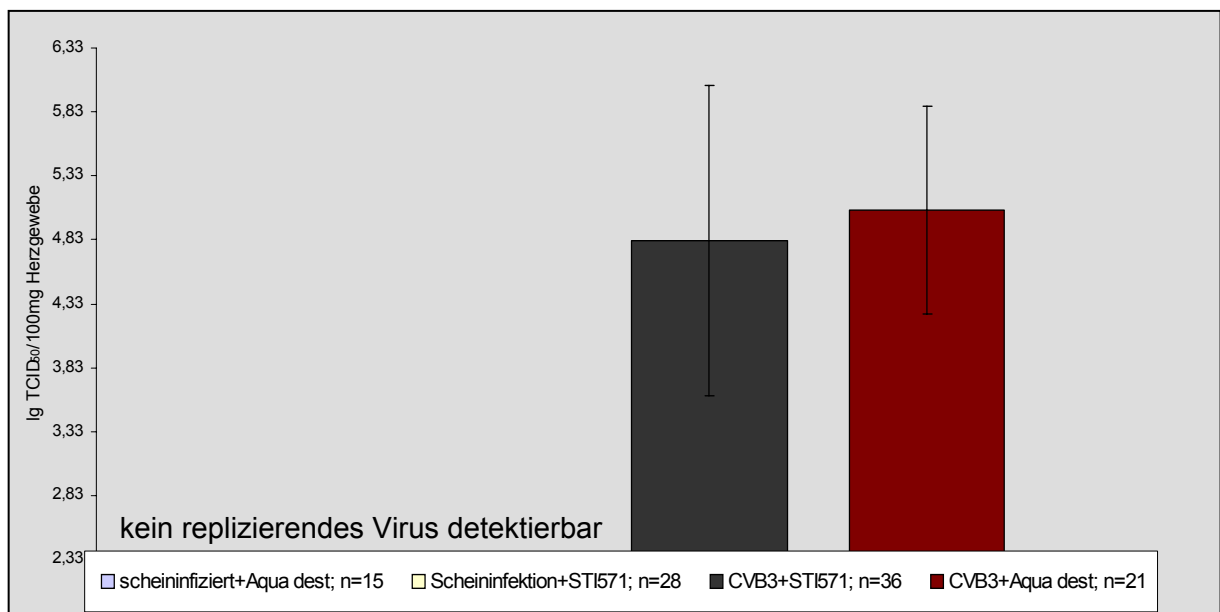


Abb. 17: Nachweis von CVB3 im Herzmuskelgewebe von MHC Klasse II ko Mäusen 21 Tage nach CVB3-Infektion und Behandlung mit und ohne STI571. Zur statistischen Absicherung der Stichprobenanzahl wurde die Summe aller Tiere verwendet. Graphisch dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen. Der Vergleich der Mittelwerte erfolgte mit dem U-Test nach Mann-Whitney. In den Gruppen der scheininfizierten Mäuse, behandelt mit STI571 oder einer Vergleichslösung, war kein replizierendes Virus feststellbar. Zwischen CVB3-infizierten und mit STI571 behandelten Mäusen (dunkelgrau) und CVB3-infizierten mit Vergleichslösung behandelten Mäusen (rot) konnte kein statistisch signifikanter Unterschied ($p > 0,05$) festgestellt werden. Die Nachweisgrenze lag bei 2,33 log TCID₅₀ pro 100 mg Gewebe.

5.2.3.2 Effekte der STI571-Behandlung auf die Entwicklung von Fibrose im chronisch entzündeten Myokard

Zur Analyse von Behandlungseffekten des PDGF-Rezeptor-Blockers STI571 auf die sich entwickelnde Fibrose im Myokardgewebe von MHC Klasse II knockout Mäusen wurden zum einen das Verhältnis des Herzgewichts zum Körpergewicht und zum anderen der Schweregrad der sich ausbildenden Fibrose gemessen.

Die lange Behandlungsdauer mit STI571 offenbarte keine Anzeichen von Toxizität oder erkennbaren Nebenwirkungen. Beide STI571-Konzentrationen – 50 mg/kg und 100 mg/kg – zeigten somit gute Verträglichkeit. Die mit STI571 behandelten Mäuse wiesen im Vergleich zu den mit einer Vergleichslösung behandelten Mäusen keinen Unterschied im ermittelten Verhältnis des Herzgewichts zum Körpergewicht auf (Tab. 13 im Anhang).

Die histologische Untersuchung der Herzmuskelschädigung durch eine CVB3-Infektion erfolgte an Paraffinschnitten, die zur Darstellung der Fibrosierung mit Siriusrot gefärbt wurden. Um quantitative Unterschiede in der fibrotischen Entwicklung differenzierter erfassen zu können, wurde die Siriusrot-Färbung mit einem Bildanalyzesystem ausgewertet. Das histologische Präparat wurde mit einer Bildanalysekamera aufgenommen und mit der Software QWin der Firma Leica analysiert. In diese Auswertung gingen alle Tiere ein, die einen positiven histopathologischen Befund im exokrinen Pankreas, verursacht durch die CVB3-Infektion, aufwiesen. In Abb. 18.2 sind die Daten der graphischen Bildanalyse der Siriusrot gefärbten Myokardschnitten dargestellt. Anzumerken im Hinblick auf diese Methode ist, dass nicht nur neu gebildetes Bindegewebe detektiert wurde, sondern das ebenso Gefäße sowie das Perikard rot dargestellt wurden. Aus diesem Grund war in Präparaten von scheininfizierten Tieren ein Rotanteil von 2 bis 4% nachweisbar, der als Hintergrundwert angesehen wurde (Abb. 18.2). Das histologische Bild von Kontrolltieren zeigte gelb gefärbte Kardiomyozyten, die von einem rot gefärbten Perikard umgeben waren (Abb. 7). Im Gegensatz dazu konnte in CVB3-infizierten MHC Klasse II knockout Mäusen am 21. Tag nach Virusinfektion eine deutliche Vermehrung des Bindegewebes – manifestiert als Fibrose – nachgewiesen werden (Abb. 7/18.1B und D). Es konnten Differenzen im gemessenen Rotanteil des Herzmuskelgewebes zwischen CVB3-infizierten Mäusen, behandelt mit STI571 und den mit einer Vergleichslösung behandelten Mäusen festgestellt werden. Ein signifikant geringerer Rotanteil war in STI571 behandelten Mäusen detektierbar (Abb. 18.2). Ferner zeigten Siriusrot gefärbte Herzmuskelpräparate von CVB3-infizierten Mäusen, die mit STI571 behandelt wurden, häufiger Granulationsgewebe (Abb. 18.1A und C). Diese netzartigen Strukturen bestimmen vornehmlich das Bild einer akuten CVB3-Infektion. Im Vergleich dazu konnten in den Myokardpräparaten von CVB3-infizierten, mit einer Vergleichslösung behandelten Mäusen, das typische Bild einer chronischen Myokarditis mit destruktiver

Zerstörung ganzer Muskelareale und massiver Bindegewebsvermehrung, vorgefunden werden (Abb. 18.1B und D).

Schlussfolgernd kann festgehalten werden, dass die STI571 Konzentrationen 50 und 100 mg/kg STI571 im Mausmodell unter CVB3-Infektion gut verträglich waren und eine signifikante Reduktion der Fibroseentwicklung bewirkten.

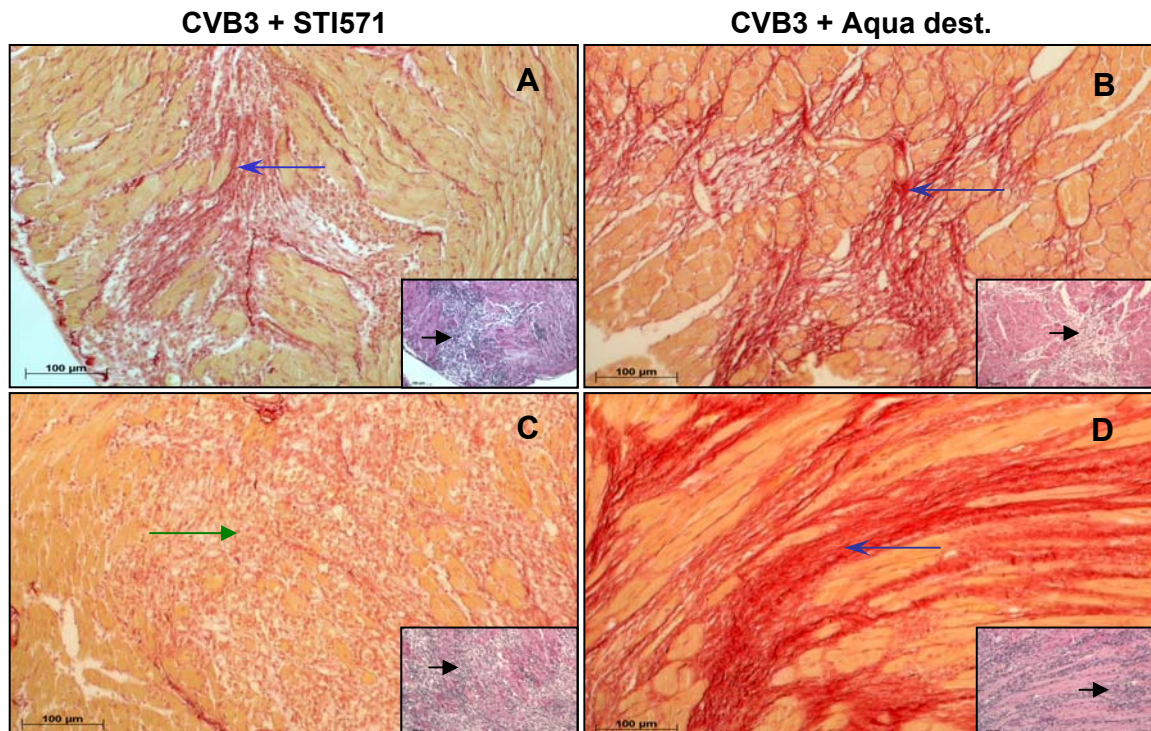


Abb. 18.1: Histopathologische Darstellung von Infiltrat und Fibrose im Myokard von CVB3-infizierten Mäusen unter STI571 Behandlung. Abgebildet sind Myokardschnitte von CVB3-infizierten STI571 behandelten (A und C) und CVB3-infizierten Aqua dest. (B und D) behandelten MHC Klasse II ko Mäusen, 21 d nach CVB3-Infektion. Die Gewebeschnitte wurden entweder mit HE (kleine Inserts) oder mit SI (große Abb.) gefärbt. Extensive inflammatorische Infiltrate (schwarze Pfeile) und eine schwächere Ausbildung der Fibrose (SI-Färbung) sind in den STI571 behandelten Myokardpräparaten sichtbar (A und C). Fibrotische Regionen sind durch blaue und GR Areale durch grüne Pfeile gekennzeichnet. (ko: knockout; d: Tag; HE: Hämatoxylin/Eosin-Färbung; SI: Siriusrot-Färbung; GR: Granulationsgewebe; 100-fache Vergrößerung).

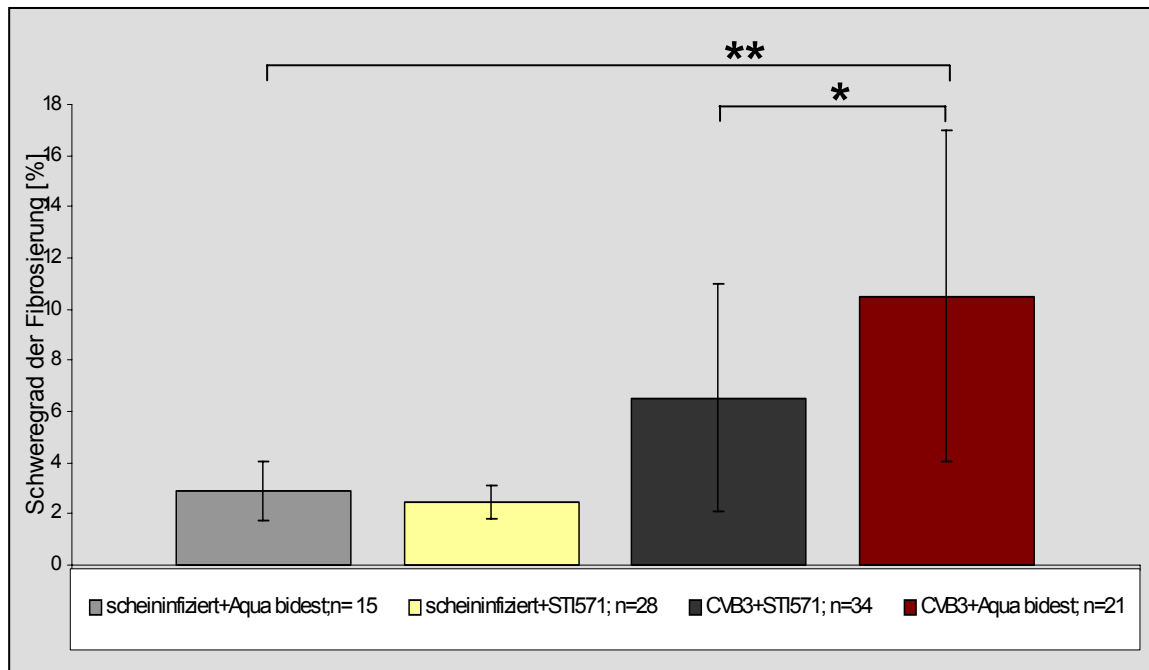


Abb. 18.2: Graphische Darstellung von Fibrose im Myokard von CVB3-infizierten Mäusen unter STI571 Behandlung. Schweregrad von ausgebildeter Fibrose im Myokard von CVB3-infizierten MHC Klasse II ko Mäusen – 21 d p. i. – mit CVB3. Die Mäuse wurden entweder mit STI571 (dunkelgrau) oder mit einer Vergleichslösung (rot) behandelt. Als Kontrolle dienten scheininfizierte Mäuse, die mit STI571 behandelt wurden (hellgelb) und scheininfizierte mit Aqua dest. behandelte Tiere (hellgrau). Zur statistischen Absicherung der Stichprobenanzahl der Mittelwerte wurden alle Tiere aus den Versuchen über 21 d Behandlung mit 50 und 100 mg/kg STI571 zusammengezogen. Graphisch dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen. Der Vergleich der Mittelwerte erfolgt statistisch mit dem U-Test nach Mann-Whitney und zeigt zwischen den Werten der CVB3-infizierten STI571 behandelten Tieren und den CVB3-infizierten, mit einer Vergleichslösung behandelten Tieren einen signifikanten Unterschied ($p < 0.05^{**/*}$). (ko: knockout; d: Tag)

5.2.3.3 Etablierung von Indikationsmarkern einer Fibrose

Nach einer CVB3-Infektion kann eine ausgebildete Fibrose im Herzgewebe mit einer Siriusrot-Färbung nicht vor dem 21 Tag p. i. dargestellt werden. Zudem erlaubt die Quantifizierung des Rotanteils keine Differenzierung zwischen ausgebildeter Fibrose und Granulationsgewebe. Dementsprechend wären andere potentielle Fibroseindikatoren, die schon sehr frühzeitig einen Behandlungserfolg im etablierten Mausmodell anzeigen von Vorteil. Es ist publiziert, dass Tenascin-C ein Marker für Fibrose ist²⁰⁰. Immunhistochemische Analysen gegen Tenascin-C lassen jedoch keine Differenzierung zwischen akuter und chronischer Infektionsphase zu. Aus diesem Grund kann Tenascin nicht als alleiniger Indikationsmarker für Fibrose verwendet werden. Mit Hilfe der RT-PCR Methode wurde neben einer Tenascin-C Expression auch die Expression von Fibronectin-Fn (gesamt Fibronectin) im Myokardgewebe untersucht. Für Fibronectin ist bekannt, dass es im Rattenmodell der Nierenfibrosen Unterschiede in der Expression zwischen akuter und chronischer Phase aufzeigt²⁰¹. Die Expression von Tenascin-C und Fibronectin-Fn wurde

durch eine semiquantitative RT-PCR analysiert. Die entstehenden PCR-Produkte wurden mittels Ethidiumbromidfärbung und Densitometrie quantifiziert. Tenascin-C konnte 21 Tage p. i. nur in den CVB3-infizierten Mäusen, behandelt mit einer Vergleichslösung, in einem moderatem Niveau nachgewiesen werden (Abb. 19), wohingegen in Myokardproben von CVB3-infizierten Mäusen, behandelt mit STI571, eine Reduktion des exprimierten Tenascin-C ersichtlich war. Ein ähnlich verlaufender Trend war in der Expression des Fibronektins erkennbar (Abb. 19). Die densitometrische Auswertung der im Agarosegel sichtbaren DNA-Banden ist in Tab. 6 dargestellt. Um die mögliche Zu- oder Abnahme der Expression von Tenascin-C und Fibronektin-Fn besser darstellen zu können, wurden die detektierten Gel-Banden der scheininfizierten, mit Vergleichslösung behandelten Kontrollmaus auf 1% und alle folgenden Gel-Banden der verwendeten Myokardproben in das entsprechende Verhältnis gesetzt.

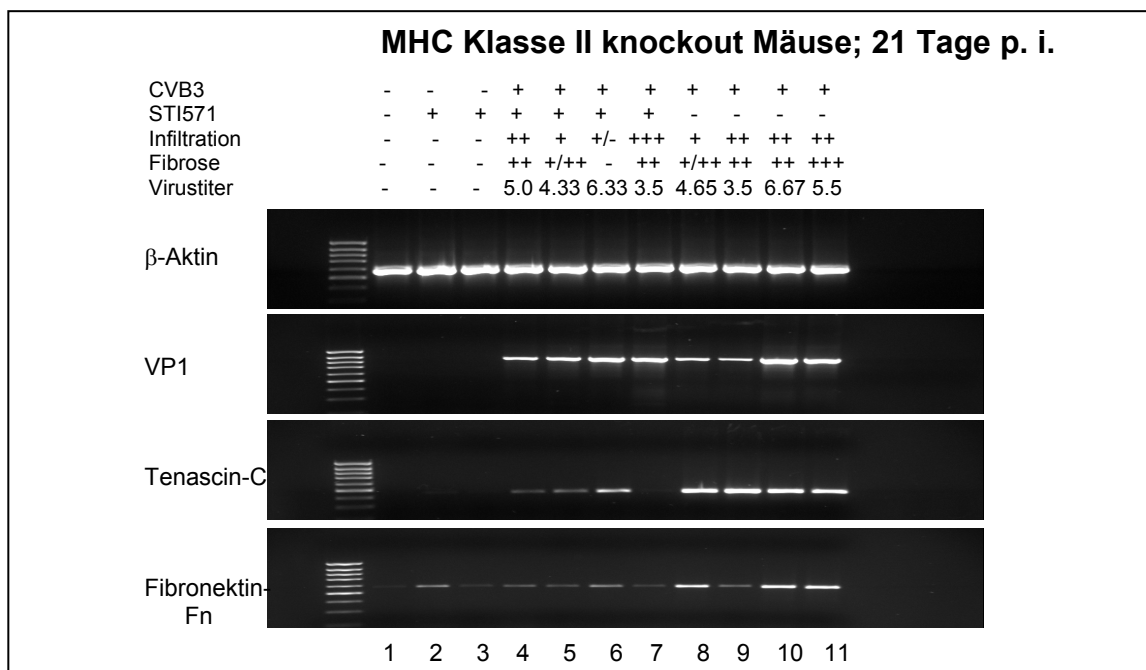


Abb. 19: Expression von Fibrosemarker. Expression von β -Aktin, VP1, Tenascin-C und Fibronektin-Fn im Myokard von MHC Klasse II ko Mäusen 21 d p. i. mit CVB3 behandelt mit STI571 oder Vergleichslösung, im Vergleich zu scheininfizierten Mäusen, behandelt mit STI571 oder Vergleichslösung. Angegeben sind zusätzlich die histologische Bewertung des Infiltrations- und Fibrosegrades der entsprechenden Mäuse sowie der analysierte CVB3-Titer im Herzmuskelgewebe. Scheininfizierte Mäuse: Reihe 1-3; CVB3-infizierte Mäuse: Reihe 4-11; Mäuse behandelt mit STI571: Reihe 2-7; Mäuse behandelt mit Aqua dest: Reihe 1 und 8-11 (MW: Molekulargewicht; bp: Basenpaare; ko: knockout; d: Tag)

Tab. 6: Darstellung der densitometrischen Auswertung, der in Abb. 19 analysierten Agarosegel-Banden von β -Aktin, Tenascin-C und Fibronectin-Fn.

	β -Aktin	Tenascin-C	Fibronectin-Fn
scheininfiziert + Aqua dest	1,0	1,0	1,0
scheininfiziert + 50 mg/kg STI571	1,2	1,5	4,3
scheininfiziert + 100 mg/kg STI571	1,0	1,6	1,2
CVB3 + 50 mg/kg STI571	1,0	4,4	2,6
CVB3 + 100 mg/kg STI571	0,9	6,4	2,1
CVB3 + 100 mg/kg STI571	1,0	17,2	4,8
CVB3 + 100 mg/kg STI571	0,9	0,8	1,5
CVB3 + Aqua dest.	1,0	42,0	13,4
CVB3 + Aqua dest.	1,0	43,4	3,4
CVB3 + Aqua dest	0,9	38,4	17,0
CVB3 + Aqua dest.	1,0	34,4	17,2

5.2.3.4 Verminderung der PDGFR-Aktivität durch Behandlung mit STI571 in der Entwicklung von Myokardfibrose

Untersuchungen über die erhöhte Aktivität des PDGF-Rezeptors während der CVB3-induzierten Myokarditis im ersten Teil dieser Arbeit zeigten eine Beteiligung des Rezeptors am sich fibrotisch entwickelnden CVB3-induzierten Krankheitsverlauf. Dennoch konnten mit den verwendeten Methoden zum Nachweis der PDGFR-Phosphorylierung (Immunpräzipitation) und der PDGF-Ligandenaktivierung (Fibroblastenaktivierung) im Myokard keine Unterschiede an verschiedenen Untersuchungszeitpunkten im chronisch verlaufenden Krankheitsbild experimentell festgestellt werden. Die Gründe hierfür könnten in technischen und methodischen Schwierigkeiten liegen. Ebenso stellten die begrenzten Ressourcen des Myokardmaterials zur Analyse des aktivierten PDGF-Rezeptors ein Problem dar. Eine indirekte Möglichkeit der Darstellung der Effektivität von STI571 im chronisch entzündeten Myokard gestattet der immunhistochemische Nachweis von aktivierter Akt/PKB-Kinase (p-Akt). Zum chronischen Zeitpunkt – 21. Tag p. i. – einer CVB3-Infektion konnte in Kryoschnitten von MHC Klasse II knockout Mäusen, die mit einer Vergleichslösung behandelt wurden, myokardiales Infiltrat durch eine Hämatoxylin-Färbung aufgezeigt werden. In den Regionen des Infiltrates zeigten sich starke Signale für p-Akt (Abb. 20B und D). Im Vergleich dazu wiesen Herzpräparate von CVB3-infizierten, mit STI571 behandelten Tieren, eine reduzierte Färbung mit Anti-p-Akt Antikörpern auf (Abb. 20A und C).

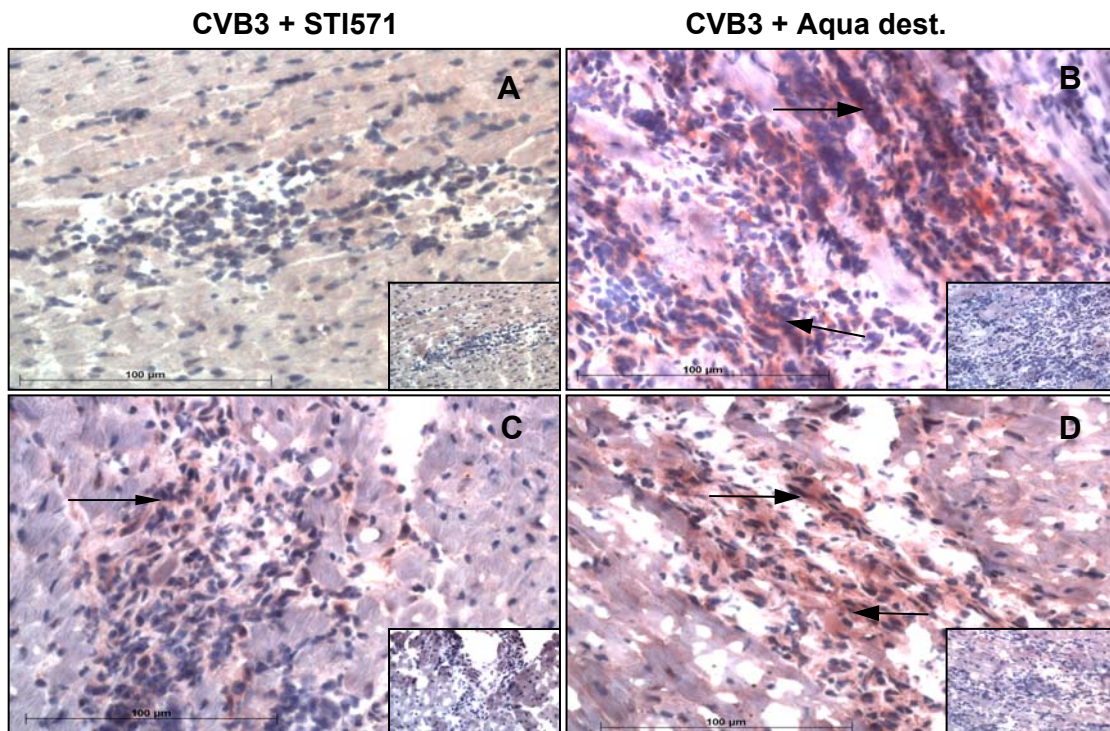


Abb. 20: Immunohistochemische Detektion von aktiviertem Akt/PKB. Kryoschnitte von CVB3-infizierten MHC Klasse II ko Mäusen, 21 d p. i., behandelt mit STI571 (**A und C**) und einer Vergleichslösung (**B und D**). Die Myokardpräparate wurden mit dem Antikörper phospho-Akt (Akt/PKB) (große Abb.) oder zur Kontrolle ohne Primärantikörper (kleine Inserts) behandelt. Schwarze Pfeile markieren Akt/PKB-immunreaktive Zellen im zellulären Infiltrat. (Hämatoxylin-Färbung; co: ohne Primärantikörper; ko: knockout; 200-fache Vergrößerung)

Im Ergebnis bleibt festzuhalten, dass die Daten aus Teil 2 der Arbeit eine effiziente Wirkung des PDGF-Rezeptor Blockers STI571 auf die Reduktion der Fibroseentwicklung *in vivo* belegen. Der oral verfügbare Tyrosin-Kinase-Hemmstoff STI571 war im etablierten Mausmodell der MHC Klasse II knockout Maus gut verträglich, im Myokardgewebe in ausreichender Konzentration zur Inhibierung der PDGF-Rezeptor-Phosphorylierung nachweisbar und zeigte keinen Einfluss auf eine bestehende CVB3-Infektion. Bezüglich der Unterdrückung bzw. Inhibierung einer sich entwickelnden Fibrose kann derzeit von einem positiven Ergebnis ausgegangen werden. Weiterführende Untersuchungen im Hinblick auf die Modalitäten des Behandlungszeitraumes werden zusätzliche Einblicke in die Effizienz des Wirkstoffes STI571 und dessen Bedeutung für therapeutische Ansätze geben.

6. Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, im etablierten Mausmodell der CVB3-induzierten Myokarditis Fibrosierungsmechanismen am chronisch entzündeten Myokard mit besonderem Augenmerk auf Faktoren des PDGF/PDGFR-Systems zu untersuchen. Ferner wurde die denkbare kausale Beteiligung dieses Systems an der Entwicklung einer Myokardfibrose durch den Einsatz eines Inhibitors der PDGFR-Signaltransduktion – STI571 – geprüft.

6.1 Rolle von Immundefizienz und Viruspersistenz für die Ausbildung einer chronischen Myokarditis

Humanpathogene Coxsackie B3-Viren gelten als die häufigste virale Ursache einer Herzmuskelentzündung und sind mit einer Insidenz von bis zu 50% als Erreger einer Myokarditis verantwortlich^{16,26}. Die genauen Pathomechanismen einer viralen bzw. chronisch verlaufenden Myokarditis sind bis zum heutigen Zeitpunkt vielfach noch ungeklärt. Ebenso ist der Übergang einer akuten Myokarditis in den chronischen Zustand mit Myokardfibrosierung eine weitere unaufgeklärte Fragestellung.

Um Fibrosierungsmechanismen im viral-induzierten Myokard zu analysieren, sind MHC Klasse II knockout Mäuse mit CVB3-Mü/J infiziert und mit histologischen, serologischen und molekularbiologischen Methoden untersucht worden. Die Ergebnisse wurden mit Wildtypmäusen (C57BL/6), die einen identischen genetischen Hintergrund (H-2^b) besitzen, verglichen. Die CD4-T-Zell defiziente MHC Klasse II knockout Maus ist durch das Fehlen des MHC II Komplexes nicht in der Lage, auf eine bestehende CVB3-Infektion, CVB3-spezifische-IgG und virusneutralisierende Antikörper zu bilden⁷¹.

Die Untersuchung des Myokards nach histologischen Parametern von immunkompetenten C57BL/6 und immundefizienten MHC Klasse II knockout Mäusen am 7. und 21. Tag nach CVB3-Infektion wurde in dieser Arbeit erneut vorgenommen, um eine Bestätigung der aus der konventionellen Tierhaltung erhaltenen Daten zum beschriebenen Krankheitsbild zu erhalten. Ebenso erfolgte die bisher ausstehende Charakterisierung eines späteren Zeitpunktes in der chronischen Phase, der 56. Tag nach CVB3-Infektion. Im Stadium der chronischen Erkrankung – 21 bzw. 56 Tage nach CVB3-Infektion – ist die Entzündungsreaktion in C57BL/6 Mäusen vollständig ausgeheilt. Im Gegensatz zu den immunkompetenten Tieren bleibt die myokardiale Infiltration in MHC Klasse II knockout Mäusen über die akute Phase hinaus bis einschließlich 56 Tage nach CVB3-Infektion bestehen. Das histologische Bild dieser Mäuseherzen entspricht Befunden, die ebenso im menschlichen myokardialen Krankheitsbild erhoben werden und kann demnach als chronische Myokarditis gewertet werden⁵⁸. Die fehlende Expression des MHC Klasse II Gens und die damit verbundene Unfähigkeit dieser Mäuse zur Ausbildung einer virusspezifischen IgG-Antikörper Antwort ist offenkundig die Ursache dafür, dass sich bei diesen

immundefizienten Mäusen bis zum 21. Tag nach CVB3-Infektion eine chronische Verlaufsform der Myokarditis entwickelt. Die weitere Zunahme der Myozytenschädigung und die damit verbundene Funktionsstörung des Myokards bis zum 56. Tag nach CVB3-Infektion gleichen dem Bild einer inflammatorischen Kardiomyopathie beim Menschen. Ähnliche Ergebnisse wurden in anderen immundefizienten Mäusestämmen erhalten. B-Zell-defiziente Mäuse entwickeln nach einer CVB3-Infektion eine persistierende Myokardinfektion mit schwerer Fibrosierung²⁰². Ebenfalls zeigten Untersuchungen an IL-4-defizienten C57BL/6 Mäusen, dass diese Tiere nach einer CVB3-Infektion eine verzögerte Viruseliminierung im Myokard aufweisen, die mit einer nachfolgenden Infiltration und Fibrosierung des Myokard in bis zu 50% der infizierten Tieren einhergeht⁷⁹. Auch bei immundefizienten CD40/BALB/c knockout Mäusen, die auf eine CVB3-Infektion keine ausreichende anti-CVB3-IgG-Antikörper entwickeln, ist die anti-CVB3-IgM-Antikörperantwort nicht hinreichend genug, um eine chronische Myokarditis und Fibrosierung in der späten Infektionsphase zu verhindern, wohingegen immunkompetente BALB/c Mäuse keine Chronizität ausbilden⁷⁷.

Für die Entstehung einer chronischen Myokarditis und die Entwicklung einer dilatativen Kardiomyopathie ist mehrfach in suszeptiblen Mäusestämmen gezeigt worden, dass eine anhaltende Entzündung sowie die Fibrosierungsprozesse im Myokard unmittelbar gekoppelt sind an eine Persistenz des Virusgenoms im Gewebe^{54,60,66,71}. In ähnlicher Weise konnten Enteroviren im Myokard von Patienten mit der Diagnose akute Myokarditis bzw. dilatative Kardiomyopathie nachgewiesen werden²⁰.

Nach dem in dieser Arbeit mittels Virustiterbestimmung sowie RT-PCR erhaltenen Daten persistiert CVB3 in der chronischen Phase der Myokarditis bis einschließlich 56 Tage nach CVB3-Infektion nur in MHC Klasse II knockout Mäusen. Die persistent infizierten Myokardzellen sind hierbei in geschädigten Herzmuskelarealen lokalisiert, welche sich in der histopathologischen Untersuchung durch eine interstitielle Fibrose, degenerierte Kardiomyozyten und vereinzelte mononukleäre Zellen auszeichnen. Der Nachweis von viral persistierenden CVB3-Genom wurde bereits früher in verschiedenen Mäusestämmen beschrieben^{54,60,66}. In der akuten Infektionsphase erfolgt nach diesen Daten in myokardialen Zellen die Synthese großer Mengen viraler plusstrang RNA (Plusstrang zu Minusstrang 100:1), während in der chronischen Phase das Verhältnis zwischen Plus- zu Minusstrang annähernd gleich ist^{54,203,204}. Die virale Genexpression nimmt mit anhaltender Viruspersistenz in den soliden Organen ab und spiegelt die eingeschränkte RNA-Synthese zu diesem Zeitpunkt wieder⁵⁴. Entsprechende Daten sind jedoch für das hier beschriebene Infektionsmodell noch nicht erhoben worden. Es ist anzunehmen, dass die eingeschränkte Antikörperproduktion, die in verschiedenen immundefizienten Mäusen zu beobachten ist, für eine bestehende Persistenz des viralen Genoms im Myokard verantwortlich ist. In der Tat weisen B-Zell-defiziente Mäuse nach einem B-Zell-Transfer aus CVB3-immunen Mäusen

eine Verringerung der Viruslast im Serum und in verschiedenen Organen auf, wodurch diese Tiere überleben²⁰². Inzwischen durchgeführte Untersuchungen an den hier verwendeten CD4-T-Zell-defizienten MHC Klasse II knockout Mäusen zeigen, dass diese nach Gabe von IgG-haltigem Serum von immunkompetenten C57BL/6 Mäusen in der Lage sind, den CVB3-Titer im Myokard bis zum 21. Tag p. i. zu senken und die Ausbildung von myokardialen Infiltraten stark zu verringern (Leipner et. al., unveröffentlichte Daten). Damit ist die kritische Rolle der Viruspersistenz für die Unterhaltung der Myokarditis überzeugend belegt worden.

Auch für das menschliche Krankheitsbild wurde gezeigt, dass die Unfähigkeit zur Antikörperproduktion zumindest zu einer erhöhten Anfälligkeit gegenüber persistierenden Coxsackievirus-Infektionen führt²⁰⁵. Die Bedeutung der TH1/TH2 ausgeprägten Immunantwort wurde auch anhand des Verlaufes der Virusmyokarditis beim Menschen deutlich. Einen günstigeren Verlauf der Krankheit weisen die Patienten mit einer TH2-vermittelten Immunantwort auf. So zeigten Patienten mit Spontanremission der Myokarditis einen TH1/TH2-Übergang, während bei einem persistierenden Entzündungsprozess ein TH1-Zytokinmuster oder TH2-Zytokinmuster mit verringertem IL-4 Spiegel dokumentiert ist⁴⁸. Ob die Anwesenheit des Enterovirusgenoms im Myokard für den klinischen Verlauf der Erkrankung bedeutsam ist, wird in der Literatur widersprüchlich diskutiert. Figulla und Mitarbeiter fanden eine verringerte Letalität und einen insgesamt günstigeren Krankheitsverlauf in Patienten mit Enterovirusnachweis^{206,207}. Eine gegensätzliche Auffassung vertrat die Arbeitsgruppe um Why et. al., die zeigten, dass ein positiver Nachweis von Enterovirusgenom im Myokard bei Patienten mit DCM mit einer signifikant höheren Letalität einherging²⁰⁸. Dessen ungeachtet scheint die Viruseliminierung eine wichtige Strategie für eine kausale Therapie zu sein. Verschiedene Therapieansätze mit Interferon, Hyperimmenserum und antiviralen Substanzen werden derzeit auf ihre Wirksamkeit getestet²⁰⁹. Gegen Enteroviren ist das Virusstatika „Pleconaril“, das die Anheftung der Viren an den Zell-Rezeptor verhindert, entwickelt worden²¹⁰. Obwohl in einer klinischen Studie bei 78% der Patienten gute Verträglichkeit nachgewiesen werden konnte²¹¹, zeigt es keine Wirksamkeit gegen den CVB3 Stamm Nancy²¹⁰.

Eine andere antivirale Therapie bei Patienten mit molekularbiologisch nachgewiesener Viruspersistenz könnte die Therapie mit Interferonen sein. Erste Daten von Patienten mit DCM und positiven Enterovirusbefund zeigten, dass eine Behandlung mit IFN- β zu einer vollständigen Viruselimination, zur Verbesserung der Pumpleistung sowie zur Reduktion der Ventrikelgröße führte²¹².

6.2 Bedeutung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren für die Myokarditis und Fibrosierung des Myokard

Der entstehende fibrotische Prozess im Herzmuskel nach einer CVB3-Infektion umfasst den Austausch von mesenchymalen Zellen und der extrazellulären Matrix und endet zumeist im Funktionsverlust des Gewebes²¹³. Verschiedene Zytokine und Wachstumsfaktoren können mesenchymale Zellproliferation und Matrixsynthese stimulieren und sind in Prozessen der pathophysiologischen Fibrose und begleitenden chronischen Myokarditis beteiligt^{214,215}.

Untersuchungen in verschiedenen Mausmodellen weisen auf die Expression von einer Vielzahl von Zytokinen im Myokard nach Induktion mit kardiotropen Viren sowohl in der akuten wie auch chronischen Phase der Infektion hin^{60,75,79}. Dass Immunmechanismen, wie die Induktion von Zytokinen, eine wichtige Rolle im Entzündungsprozess des Herzmuskels spielen, kann anhand der Untersuchung von Biopsien von Patienten mit akuter Myokarditis bzw. dilatativer Kardiomyopathie angenommen werden. In diesem Material wurden deutlich erhöhte Zytokinspiegel nachgewiesen^{63,216-218}.

Um das Zytokinspektrum im Krankheitsverlauf der CVB3-induzierten Myokarditis mit besonderem Augenmerk auf fibrotische Prozesse zu untersuchen, ist in der vorliegenden Arbeit das Expressionsmuster der Zytokine IFN- β , IFN- γ , IL-2, IL-10, IL-12, TNF- α , IL-1 und IL-6 analysiert worden. Am 7. Tag p. i. ist eine mäßige bis starke Expression der untersuchten Zytokine nachweisbar, was auf eine maximal stimulierte Immunantwort schließen lässt. Die untersuchte Zytokinantwort geht mit dem Nachweis des Virusgenoms und der zellulären Infiltration im Myokard in dieser Phase der CVB3-Infektion einher. Eine mögliche Quelle der Zytokinexpression während der akuten Phase der Myokarditis könnten myokardiale Zellen, wie Myozyten, Fibroblasten und Endothelzellen darstellen. Vor allem aber dürfte der Anstieg der Expression der Zytokine durch infiltrierende Leukozyten erfolgen^{75,219,220}. Auch in anderen tierexperimentellen Modellen der CVB3-induzierten Myokarditis konnte während der akuten Phase eine verstärkte Expression von Zytokinen nachgewiesen werden^{60,67,70,75}.

Mit der Eliminierung von Coxsackie B3-Viren bis zum 21. Tag p. i. aus dem Myokard und einem Abklingen der Entzündungsreaktion in der immunkompetenten C57BL/6 Maus geht eine starke Reduktion der Zytokinexpression im Herzgewebe einher (Abb. 9). Eine erhöhte Expression der Zytokine erfolgte in der chronischen Phase – 21 und 56 Tage p. i. – in den Mäusen mit persistierendem Virus. Ähnliche Ergebnisse werden in anderen Mausmodellen erhalten, in denen sich durch eine Viruspersistenz eine chronische Herzmuskelentzündung ausbildet^{60,67}. Die chronische Phase der CVB3-induzierten Myokarditis in MHC Klasse II knockout Mäusen ist demnach nicht nur charakterisiert durch die Persistenz des viralen Genoms sondern ebenso durch eine anhaltende Expression der Zytokin-mRNA. Einzelne

Zytokine des Immunsystems scheinen eine besondere Rolle in der anhaltenden Entzündung im Myokard einzunehmen und sollen im Folgenden separat diskutiert werden.

Das antivirale Zytokin IFN- β , ein in die Gruppe der Typ-I-Interferone zu zählendes Zytokin, wird nur in den Mäusen exprimiert, die im chronischen Entzündungsstadium persistierende Viren im Myokard aufweisen. Ähnliche Ergebnisse wurden auch bei NMRI-Mäusen erhalten, die nach einer CVB3-Infektion eine chronische Myokarditis ausbilden⁶⁰. IFN- β wird durch die Virusreplikation induziert und scheint protektive Wirkungen für die betroffenen Mäuse aufzuweisen, da IFN-I-Rezeptor knockout Mäuse eine 100%ige Mortalität auf Grund einer massiven Virusreplikation in der Leber zeigen²²¹. Jedoch vermag das endogene Typ-I-IFN, im Gegensatz zum exogen zugeführten IFN- β , die Virusreplikation im Herzen nicht vollständig zu unterdrücken²²².

Eine starke Persistenz des Zytokins IFN- γ – eines Typ-II-Interferons – im Myokard von MHC Klasse II knockout Mäusen in der späten Phase der CVB3-induzierten Myokarditis wird ebenso in anderen experimentellen Modellen von chronischer Myokarditis in der Maus^{60,61} und bei Patienten mit DCM⁶³ gefunden. IFN- γ besitzt antivirale Wirkmechanismen durch Hemmung der CVB3-Replikation²²³. Zugleich vermag eine IFN- γ -Antwort im murinen Mausmodell eine schwere chronische Myokarditis durch eine Reduzierung der Mastzell-Degranulation und profibrotischer Zytokinantwort (TGF- β , IL-1 β) zu vermindern²²⁴. Es kann entsprechend angenommen werden, dass die beobachtete IFN- γ -Persistenz ebenfalls eine protektive Wirkung auf die Mäuse hat.

Die inflammatorischen Zytokine IL-6, IL-1 α und TNF- α können 21 bzw. 56 Tage nach CVB3-Infektion in Mäusen mit persistierendem Virustiter im Myokard weiterhin in uneingeschränkt hoher Expression detektiert werden. Für diese Zytokine (IFN- γ und TNF- α) ist bekannt, dass sie die Expression der induzierbaren Stickoxidsynthetase (iNOS) stimulieren, welche die Bildung von Stickoxid (NO) katalysiert^{67,225}. Möglicherweise beruht die anti-CVB3-Wirkung von NO auf der Inhibition der viralen Proteasen 3C und 2A, deren Cystein am aktiven Zentrum nitrosyliert und dadurch inaktiviert wird. NO führt damit zur Inhibition der Dystrophinspaltung und zur Unterbrechung des viralen Lebenszyklus^{52,225}. Demnach kann für diese Zytokine vermutet werden, dass die anhaltende Expression im Myokard im Sinne einer verlängerten Immunabwehr gegen persistierende Coxsackie B3-Viren zu werten ist. Jedoch könnten diese inflammatorischen Zytokine an der Induktion myokardialer Schäden und der Entstehung der Fibrose während der chronischen Myokarditis beteiligt sein. So ist bekannt, dass eine kontinuierliche IL-6 Expression im Myokard zur Schädigung von Myozyten führt²¹⁸. In TNF- α -transgenen Mäusen entwickelt sich eine schwere myokardiale Fibrose und Kardiomegalie, die durch eine transmurale Myokarditis, ein dilatiertes Herz und durch myokardiale Apoptose gekennzeichnet ist^{104,106}. Ein ähnliches Bild einer chronischen Myokarditis ist im IL-1 α transgenen Mausmodell zu finden¹⁰⁸. Unter Bedingungen einer

systemischen TNF- α -Expression im frühen Immunstadium von Infektionen scheint diese Reduktion ein begünstigender Faktor des schweren Krankheitsverlaufes zu sein. Die Applikation von anti-TNF- α Antikörpern vor Versuchsbeginn hatte einen therapeutischen Effekt bezüglich der auf die Überlebensrate der Mäuse²²⁶. Im TNF- α knockout Mausmodell für C57BL/6 Mäuse, infiziert mit einer letalen CVB3-Variante, war ein Überleben der TNF- α -defizienten Tiere gegenüber den C57BL/6-Wildtypmäusen beobachtbar, was den Schluss zuließ, dass TNF- α am fulminanten Verlauf der Myokarditis beteiligt war²²⁷. Im menschlichen Krankheitsbild sind die Zytokine IL-6 und TNF- α unabhängige Prädiktoren für eine erhöhte Mortalität bei Herzinsuffizienz und werden regelmäßig bei Patienten mit DCM gefunden^{228,229}. Das fibrinogene Zytokin TGF- β bewirkte im transgenen Mausmodell die Entwicklung einer kardialen Hypertrophie^{111,230}. TGF- β wirkt stark chemotaktisch für Makrophagen und Monozyten und induziert die Synthese von Zytokinen (IL-1 und IL-6) in Makrophagen. Diese stimulieren die Proliferation von Fibroblasten und haben demnach einen beträchtlichen Einfluss auf die Ausbildung der extrazellulären Matrix. Die Expression von TGF- β -RNA ist im Rahmen dieser Arbeit in den MHC Klasse II knockout Mäusen nicht untersucht worden, da bereits aus anderen Mausmodellen bekannt war, dass TGF- β ab der frühen Infektionsphase in konstant hohem Niveau exprimiert wird⁶⁰.

6.3 Erhöhte PDGF-Produktion im Herzgewebe korreliert mit Infiltration und Fibrose

Ein wesentliches Element, welches zur Entstehung einer Herzinsuffizienz beiträgt, ist die Fibrosierung des Myokards als Folge eines chronischen Entzündungsprozesses. Die in der Entzündungsreaktion proliferierenden kardialen Fibroblasten können, durch vermehrte Bildung von Kollagen und Fibronectin, Gewebsschädigungen hervorrufen^{59,231}. Verschiedene Stimulatoren, wie IL-1, TNF- α , TGF- β , Angiotensin II und Aldosteron führen in Fibroblasten zur Induktion der Kollagensynthese und des extrazellulären Umbauprozesses^{59,213}. Eine Überexpression eines dieser Stimulatoren kann entsprechend zu hypertrophen Myokardfunktionsstörungen führen. Die profibrotische Wirkung der Überexpression von TNF- α und TGF- β wurde bereits angesprochen.

Ein weiterer wichtiger Mediator, dessen potentielle Eigenschaft zur Induktion von Fibrosierungsprozessen mehrfach belegt wurde, ist der Wachstumsfaktor aus Blutplättchen¹⁴¹. Eine vermehrte Expression von PDGF-Isoformen ist bei verschiedenen inflammatorischen und profibrotischen Erkrankungen, wie Arteriosklerose, Restenose, Lungenfibrose, Glomerulonephritis und rheumatoider Arthritis, gefunden worden¹¹⁶.

Die im Rahmen dieser Arbeit erstmals im Modell der CVB3-induzierten Myokarditis analysierte mRNA-Expression der PDGF-Isoformen A, -B und -C korrelierte sehr gut mit der

Entzündung bzw. dem inflammatorischen Geschehen im Myokard beider Mäusestämme während der akuten und chronischen Phase der Infektion (Abb. 10). Die Lokalisation der erhöht exprimierten PDGF-Isoformen im CVB3-infizierten Herzgewebe deutet darauf hin, dass eine Expression in Bereichen von inflammatorischen Zellen vorkommt. Folglich könnten die infiltrierenden Zellen im massiven Entzündungsinfiltrat, das hauptsächlich aus CD11b⁺-Zellen besteht, die vorrangig auf Makrophagen, natürlichen Killerzellen und dendritischen Zellen gefunden werden⁷¹, die Quelle der PDGF-Sekretion sein. In diesem Kontext war PDGF-C von besonderem Interesse, da dieses im Herzmuskel von transgenen Mäusen zur Proliferation kardialer Fibroblasten führt und eine Myokardfibrose induziert^{109,121}. Im CVB3-infizierten Myokard konnte PDGF-C unter Verwendung einer RNA-Sonde in der In Situ-Hybridisierung direkt in den Infiltraten lokalisiert werden (Abb. 11). Neben der Untersuchung auf RNA-Ebene wurde auch eine immunhistochemische Analyse der PDGF-Isoformen im Myokard vorgenommen. Alle untersuchten PDGF-Isoformen zeigten unter Inflammation starke immunhistochemische Signale im Bereich der Infiltrate, die mit dem Abklingen der Entzündung in C57BL/6 Mäusen nicht mehr nachweisbar sind, während im persistent entzündeten Myokard ein gleich bleibender Nachweis der Signale bestehen bleibt (Abb. 13). Die erhaltenen Daten, sowie parallel erfolgte analoge Untersuchungen in anderen immunkompromitierten Mäusestämmen,²³² unterstützen die Auffassung, dass PDGF-Faktoren, insbesondere PDGF-C einen kausativen Beitrag zur Ausbildung der kardialen Fibrose leisten könnte. Für PDGF-C ist beschrieben worden, dass es in allen drei Phasen der Wundheilung – Inflammation, Proliferation und Remodelling – involviert ist²³³ und im Besonderen in den Phasen der Proliferation und des Remodellings einen vermehrten Anstieg von MMP's und TIMP's vermittelt²³⁴. Es kann vermutet werden, dass die anhaltende Inflammation im Herzmuskelgewebe von MHC Klasse II knockout Mäusen, ausgelöst durch die persistierende CVB3-Replikation, zu einer kontinuierlichen PDGF-C Expression führt. Die nachfolgend permanent stimulierte Proliferation von Fibroblasten durch PDGF-C würde zu der beobachteten Bindegewebsvermehrung beitragen.

Die PDGF-D Isoform, ist im Kontext der viral-entzündeten chronischen Myokarditis wegen ihrer geringen Beteiligung an inflammatorischen Prozessen der Wundheilung nicht untersucht worden²³⁵.

Neben erhöhten Spiegeln von PDGF-Faktoren konnte in den CVB3-infizierten Herzen auch PDGFR- α nachgewiesen werden. Die Expression von PDGFR- α war im entzündeten Gewebe ebenfalls erhöht, ähnlich wie in anderen Systemen bereits früher beschrieben^{236,237}. Eine Aussage über eine erhöhte PDGF-Rezeptor Aktivität in residenten Fibroblasten, als Konsequenz einer PDGF-Überexpression, erwies sich jedoch als schwierig. Um dennoch einen Beleg für eine PDGFR-Aktivierung indirekt zu erhalten, ist ein wichtiger Signalmediator der PDGF-Rezeptoren – die Akt/PKB-Kinase – mittels immunhistochemischen Nachweises

analysiert worden. Die stark erhöhte spezifische Färbung von p-Akt, die mit PDGFR- α im Gewebe lokalisiert war, wies klar auf einen aktivierten Zustand der PDGF-Rezeptoren im entzündeten Gewebe hin.

Neben seiner profibrotischen Wirkung könnte PDGF durch seine chemotaktische Anziehungskraft auf neutrophile Zellen, Makrophagen und Fibroblasten auch zur weiteren Aufrechterhaltung der Inflammation im Herzmuskel beitragen. Fibroblasten und Makrophagen vermögen PDGF selber zu sezernieren, wobei eine Wechselwirkung mit anderen Zytokinen, wie IFN- γ , IL-1 und TGF- β existiert^{116,238}. IL-1 und TGF- β sind beide in der Lage, die Induktion und die Aktivierung von PDGF und seinen Rezeptoren zu bewirken^{239,240}.

Ein möglicher therapeutischer Ansatzpunkt zur Verminderung einer Fibrosierung des Myokards könnte somit in der Blockade eines der PDGF-Liganden oder der PDGF-Rezeptoren liegen.

6.4 STI571/Glivec vermindert die Fibroseentwicklung im CVB3-infizierten Myokard

Die Bedeutung der PDGF-Familie und seiner Rezeptoren in der Entwicklung von Fibrose ist anhand von Tiermodellen bereits für die Lunge- und für die Nierenfibrose beschrieben^{142-145,148}.

Ein experimenteller Ansatz zum Nachweis einer kausalen Beteiligung des PDGF/PDGFR-Systems an der Fibrosierung ist die Blockade der Tyrosinkinase-Aktivität der PDGF-Rezeptoren. Alle bisher identifizierten Signalwege und alle zellulären Reaktionen, die auf einer PDGF-Stimulation basieren, erfordern die Aktivierung der PDGFR-Tyrosinkinase^{125,129}. Möglichkeiten zur experimentellen Ausschaltung dieses Systems bestehen auf den Ebenen der Ligandenbindung, der Rezeptordimerisierung, der Tyrosinkinase-Aktivität oder in „stromabwärts“ gelegenen Schritten der Signaltransduktion des PDGF/PDGFR-Systems¹²⁵.

Erste Studien unter Verwendung der Verbindung AG1295 zeigten, dass diese bei lokaler Applikation im Rattenmodell der einseitigen Ureterligatur eine Abschwächung der ausgebildeten Nierenfibrose bewirkten¹⁴⁸. Vor kurzem präsentierten Eitner und Mitarbeiter, dass der Prozess einer entstehenden Nierenfibrose mit einer Hochregulation der PDGF-C Isoform assoziiert ist²⁴¹. Die Aktivierung und die nachfolgende Phosphorylierung der PDGF-Rezeptoren scheinen kausale Faktoren für die Organfibrosierung unter Beteiligung des PDGF/PDGFR-Systems zu sein.

Ein potenter PDGFR-Tyrosinkinase-Inhibitor, der für den Einsatz *in vivo* geeignet ist, ist das Imatinib-Derivat (STI571/Glivec). Dieser Protein-Tyrosinkinase-Inhibitor, fand zunächst Eingang in die klinische Anwendung, wegen seines Vermögens, die Tyrosinkinase-Aktivität von Bcr-Abl sehr stark und spezifisch zu hemmen¹⁸⁵ und dadurch Apoptose zu

induzieren^{180,182}. Auf dieser Grundlage eignete er sich zur Therapie der chronisch myeloischen Leukämie (CML). STI571 hemmt jedoch auch die Tyrosinkinase c-Abl, Arg, PDGFR- α und - β und c-Kit¹⁷². Damit besteht mit dieser Verbindung die Möglichkeit die kausale Beteiligung des PDGF/PDGFR-Systems bei der CVB3-induzierten Myokardfibrose zu prüfen.

6.4.1 Verfügbarkeit des Tyrosinkinase-Inhibitors STI571 im murinen Myokard

Zur Testung eines möglichen funktionsfähigen Inhibitors (STI571) der PDGFR-Kinase im System der CVB3-induzierten chronischen Myokarditis mit Entwicklung von massiver Myokardfibrose sind MHC Klasse II knockout Mäuse mit Coxsackievirus B3 (Mü/J) infiziert und 2x täglich oral mit STI571 behandelt worden. Experimentelle Vorversuche ergaben, dass die oral verabreichten Dosen von 2x täglich 50 bzw. 100 mg/kg STI571 eine gute Verträglichkeit in den Mäusen zeigten und zu einer ausreichenden Konzentration im Herzmuskel führten, um die CVB3-getriggerte PDGFR-Aktivierung zu unterbinden. Bei einer dritten Behandlungsdosis – 150 mg/kg STI571 – konnte zwar die höchste Konzentration von STI571 im Herzmuskelgewebe festgestellt werden, jedoch schien diese Dosis für die behandelten Mäuse toxisch zu sein. Die maximal verträgliche und effektive Dosis des Wirkstoffes STI571 beim Menschen in erbrachten Versuchen der initiierten klinischen Phase I-Testung betrug 300 mg/d pro 70 kg Körpergewicht (durchschnittliches Körpergewicht einer erwachsenen Person). In der klinischen Phase II, Testung in der chronischen CML-Phase wurden 400 bzw. 600 mg/d eingesetzt (5,7- 8,6 mg/kg)¹⁹¹. Die verabreichte Dosis von STI571 an MHC Klasse II knockout Mäuse lag im Vergleich deutlich höher. Der IC₅₀-Wert von STI571 beträgt *in vitro* für PDGF-Rezeptoren ca. 0,1-0,3 μ M/²⁴². Mit einer 150 mg/kg STI571-Behandlung über 3 Tage konnte im Myokardgewebe von MHC Klasse II knockout Mäusen eine Konzentration von ca. 0,92 μ M/l, bei scheininfizierten Mäusen und von bis zu ca. 7,67 μ M/l bei CVB3-infizierten Mäusen detektiert werden. Diese Ergebnisse implizieren, dass STI571 über die orale Applikationsroute im Myokardgewebe in ausreichender Konzentration vorliegt, um eine PDGFR-Aktivierung effizient zu unterbinden. Es ist möglich, dass in den entzündeten Herzen eine verbesserte Aufnahme von STI571 erfolgt. Jedoch sind die Zahlen der zur kardialen Verfügbarkeit analysierter Tiere bisher zu klein, um diese Aussage sicher treffen zu können.

Die Analyse des Körper- und des Herzgewichtes der mit STI571 behandelten Mäuse ergab eine gute Verträglichkeit der verabreichten STI571 Dosen 50 und 100 mg/kg. In scheininfizierten Myokardproben von MHC Klasse II knockout Mäusen, welche mit STI571 behandelt wurden, konnten keine pathologischen Abnormalitäten im Herzmuskelgewebe vorgefunden werden, die auf eine toxische Reaktion des Medikamentes hätte schließen können. Im Herzmuskelgewebe von CVB3-infizierten, STI571-behandelten MHC Klasse II

knockout Mäusen konnte neben den viralen Schädigungen keine zusätzlichen myokardialen Beeinträchtigungen vorgefunden werden.

6.4.2 STI571 inhibiert die PDGF-Rezeptor Aktivierung *in vivo*

Die biochemische oder immunhistochemische Analyse der PDGFR-Aktivierung und ihrer Blockade durch STI571 im Myokard wäre wünschenswert. Immunpräzipitationen und nachfolgende Immunoblot-Analysen stoßen auf Grund des geringen zur Verfügung stehenden Myokardmaterials und der damit verbundenen niedrigen Rezeptorausbeute an die Nachweisgrenze. Dennoch konnte im CVB3-infizierten Myokardgewebe von MHC Klasse II knockout Mäusen eine erhöhte PDGFR-Aktivierung nachgewiesen werden, welche durch die Behandlung mit STI571 reduziert wurde (Abb. 16). Die derzeit in der Literatur dargestellte inhibierende Wirkung des STI571 auf die PDGFR-Aktivierung *in vivo*, in Hinblick auf eine mildere Ausbildung von Organfibrose, erfolgte zumeist am Rattenmodell²⁴³. Die hierbei untersuchten Organe, wie Lunge, Herz oder Leber weisen im Vergleich zu dem in dieser Arbeit verwendeten murinen Myokard eine höhere Material- und damit Rezeptorausbeute auf. Eine Möglichkeit, die PDGFR-Aktivierung und deren Hemmung durch STI571 im CVB3-induzierten murinen Myokard besser darzustellen, wäre eine radioaktive Markierung der Immunpräzipitate und die Auswertung über SDS-PAGE und Autoradiographie²⁴⁴.

Als eine indirekte Möglichkeit die Effizienz von STI571 auf die PDGFR-Aktivierung im Herzmuskelgewebe von immundefizienten MHC Klasse II knockout Mäusen darzustellen, eignet sich wiederum der immunhistochemische Nachweis von Akt/PKB. Durch eine Behandlung der Mäuse mit STI571 über 20 Tage war eine Reduktion der immunhistochemischen Färbung von aktivierten Akt/PKB im myokardialen Infiltrat beobachtbar (Abb. 20). Diese Betrachtung ist konsistent damit, dass STI571 die Proliferation von Fibroblasten durch eine Inhibierung der PDGFR-Aktivierung und -Phosphorylierung und der nachgeschalteten Signalwege – p-Akt – unterdrückt. Dennoch wären weitere und verbesserte Analysen nötig, um qualitativ bessere Daten und Informationen zur örtlichen Lokalisation der PDGFR-Signale im Myokardgewebe zu erhalten. Sinnvoll wäre vor allem, geeignete Antikörper gegen den aktivierten PDGF-Rezeptor in der Immunhistochemie einzusetzen, um die Inhibierung der Rezeptoraktivität durch den Tyrosinkinase-Hemmer STI571 besser darstellen zu können. Solche Antikörper waren zum Zeitpunkt der Durchführung dieser Arbeit noch nicht verfügbar.

6.4.3 Verminderte Myokardfibrosierung durch eine STI571-Behandlung

Die Ergebnisse im ersten Teil dieser Arbeit deuten darauf hin, dass eine anhaltende Expression von PDGF-Isoformen, speziell PDGF-C, im Myokard von immundefizienten Mäusen zur Entstehung der Fibrose beiträgt. Die Ausbildung einer viral-induzierten Myokardfibrose beginnt in immundefizienten MHC Klasse II knockout Mäusen zwei Wochen nach CVB3-Infektion und ist drei Wochen nach Infektion im gesamten Herzmuskel detektierbar⁷¹. Die Behandlung der Mäuse mit STI571 erfolgte deshalb vom 1. bis zum 20. Tag nach CVB3-Infektion.

Einige *in vitro* Studien haben gezeigt, dass verschiedene niedermolekulare Inhibitoren, wie z. B. der antifibrotisch wirksame Serin-Elastase-Hemmer ZD0892 oder der Tyrosinkinase-Inhibitor PP2, Einfluss auf die Virusreplikation von Enteroviren durch Blockade der viralen 2A Protease, durch Herunterregulierung der Zell-Protein-Synthese des Wirtes sowie durch eine Reduzierung der viralen Polypeptidsynthese ausüben können^{245,248}. Um zu prüfen, ob STI571 die Virusreplikation von Coxsackievirus B3 im Herzmuskel verändert, ist der Virustiter im Myokard von MHC Klasse II knockout Mäusen 21 Tage nach CVB3-Infektion untersucht worden. Die erhaltenen Daten zeigten, dass eine Behandlung mit STI571 keinen Einfluss auf die CVB3-Replikation im Myokardgewebe von MHC Klasse II knockout Mäusen auszuüben vermag (Abb. 17). Damit kann ausgeschlossen werden, dass die beobachteten Effekte auf die Fibrosierung als Folge von Effekten der Virusreplikation auftraten.

Die durch eine CVB3-Infektion verursachte pathologische Veränderung des Bindegewebes im Myokard kann mit der Siriusrot-Färbung in histologischen Präparaten dargestellt werden. Die Auswertung der Präparate von MHC Klasse II knockout Mäusen, die mit STI571 behandelt wurden, zeigte im Vergleich zu Präparaten von CVB3-infizierten und mit einer Vergleichslösung behandelten Mäusen, eine signifikant geringere Ausbildung der rotgefärbten Areale. Diese Ergebnisse zeigen deutlich eine Hemmwirkung von STI571 in Bezug auf die Ausbildung der Fibrose (Abb. 18).

Während der Erstellung dieser Arbeit haben andere Arbeitsgruppen Ergebnisse zur Wirkung von STI571 in anderen Fibrosierungsmodellen vorgelegt. Im Modell der induzierten Leberfibrose in Ratten führt eine Behandlung mit STI571 zu einer Verminderung des induzierten Krankheitsbildes. Gleichzeitig konnte durch die Behandlung mit STI571 in diesem Modell eine Inhibierung der Proliferation von Myofibroblasten nachgewiesen werden²⁴⁶. In der Angiotensin-II-induzierten kardialen Hypertrophie und interstitiellen Myokardfibrose in Ratten konnte durch eine STI571-Behandlung eine Abschwächung der Myokardfibrose, durch Inhibierung der PDGFR- β -Phosphorylierung und der ERK-1/2-Aktivierung beobachtet werden²⁴⁷. Im Krankheitsbild der CVB3-induzierten Myokarditis führt eine Inhibierung der Src-Protein-Tyrosinkinase und der extrazellulären Signalregulierende Kinase (ERK-1/2), ein stromabwärts gelegener Mediator der Tyrosinkinasen, durch PP2, einem Src-Protein-

Tyrosinkinase-Inhibitor zur Hemmung der viralen Replikation in Kardiomyozyten²⁴⁸. Diese Daten stützen die Hypothese, dass eine Hemmung der Proliferation von Fibroblasten eine wichtige Rolle für die Abschwächung der Fibrose durch einen Tyrosinkinase-Inhibitor, wie z. B. STI571, spielt.

Eine weitere Nachweismöglichkeit des antifibrotischen Effektes von STI571 im Myokardgewebe liegt in der biochemischen Analyse von Hydroxyprolin. Dieses hat mit 25% neben Glycin (30%) im normalen Kollagengewebe von Säugetieren den höchsten Aminosäureanteil. Die mit der Fibroseentwicklung einhergehende vermehrte Bindegewebsproliferation resultiert zugleich in einem Anstieg des Kollagenanteils und damit auch im Hydroxyprolinzuwachs^{110,245,249}. Ebenso konnte auch bei Patienten eine antifibrotische Wirkung von STI571 festgestellt werden. In Patienten mit CML, für deren Behandlung der Tyrosinkinase-Wirkstoff STI571 seine Zulassung erhielt, kann durch die Behandlung mit STI571 eine Reduzierung von Knochenmarksfibrose festgestellt werden²⁵⁰.

Im Modell der Nierenfibrose in Ratten konnte mit einer STI571-Behandlung neben der verminderten Anzahl von interstitiellen Fibroblasten und Myofibroblasten ebenso eine Reduzierung in der Expression und Akkumulation des Kollagens vom Typ III und IV sowie des Fibronectin beobachtet werden⁹⁶. Laut Literatur ist bekannt, dass PDGF für ein erhöhtes Expressionsniveau von MMP und TIMP im Gewebe verantwortlich ist²³⁴. Im Modell der durch Schweineseren induzierten Leberfibrose in Ratten kann durch eine STI571-Gabe nicht nur eine Reduktion der Aktivierung des PDGF/PDGFR-Systems im Organ erreicht werden, vielmehr wird auch eine unterdrückende Wirkung auf die TIMP-1 Expression ausgeübt²⁴³.

Die extrazellulären Matrixbestandteile, Tenascin-C²⁰⁰ und Fibronectin-Fn²⁰¹ gelten in der Literatur ebenfalls als Indikatoren zum Nachweis von Fibrose. Tenascin-C und Fibronectin-Fn wurden in den hier vorgesehenen Untersuchungen am Myokard von CVB3-infizierten MHC Klasse II knockout Mäusen auf der Ebene der mRNA-Expression als Fibroseindikatoren herangezogen (Abb. 19). Die in dieser Arbeit vorgelegten Ergebnisse und die diskutierten publizierten Daten unterstreichen deutlich das Potential des Tyrosinkinase-Hemmers STI571 als mögliches neues Therapiekonzept bei fibrotischen Prozessen.

6.4.4 Der Einfluss weiterer Faktoren auf Fibrosierungsprozesse

Neben PDGF/PDGFR-System ist ein weiterer wesentlicher Fibroseinduktor der transformierende Wachstumsfaktor-beta (TGF- β). Untersuchungen an TGF- β überexprimierenden Mäusen zeigten eine Entstehung von interstitieller Fibrose in der Lunge²⁵¹ und im Myokard¹¹¹. Zur Rolle der Wirkmechanismen von TGF- β bei der Myokarditis bzw. der Fibrosierung des Herzens sind bislang nur wenige Daten verfügbar. In der CVB3-induzierte Myokarditis als auch bei der DCM konnten erhöhte TGF- β -Spiegel und ein Einfluss auf die Kollagensynthese nachgewiesen werden^{252,253}.

Ähnlich wie beim PDGF/PDGFR-System ist für die Aktivierung der TGF- β nachgeschalteten Signalwege, die Phosphorylierung der TGF- β -Rezeptoren erforderlich. Der durch vielfältige Untersuchungen gut etablierte Signaltransduktionsweg von TGF- β führt nach Ligandenbindung und Rezeptoraktivierung zur Phosphorylierung des Smad2/3-Komplexes. Dieser bildet mit Smad4 einen heterodimeren Komplex aus^{86,93,94}. Neue Studien legen nahe, dass TGF- β auch unabhängig vom Smad2/3-Weg über die Aktivierung der c-Abl-Kinase, Zellen stimulieren kann⁹⁵. Damit könnte der c-Abl-Kinase eine neue Funktion zugeordnet werden. STI571 ist nicht nur ein potenter Hemmstoff der Bcr-Abl-Kinase, sondern auch des entsprechenden Proto-Oncogen-Produktes c-Abl¹⁸⁵.

In der experimentell induzierten Lungenfibrose in Ratten konnte eine Beteiligung von TGF- β an der Fibroblastenproliferation belegt werden. Diese Proliferation kann durch eine direkte Behandlung mit STI571 vermindert werden^{95,96}. Die Aktivierung der c-Abl-Kinase durch TGF- β soll dabei unabhängig von der Phosphorylierung des PDGF-Rezeptors oder dessen Expression geschehen. Die Inhibierung oder der Verlust der c-Abl-Kinase kann jedoch eine durch TGF- β induzierte interstitielle Infiltration von Makrophagen oder anderen Entzündungszellen im Krankheitsgeschehen über die Aktivierung des Smad2/3-Signalweges nicht verhindern. Stattdessen führt die Hemmung der c-Abl-Kinase zu einer selektiven Hemmung solcher TGF- β -vermittelten Funktionen, welche für die Expression von extrazellulären Matrixbestandteilen und die Zellproliferation und somit für die Fibrosierung wichtig sind^{95,96,243}.

Für die hier dargestellten Untersuchungen kann nicht ausgeschlossen werden, dass zumindest ein Teil der antifibrotischen Wirkung von STI571 über die Hemmung dieses c-Abl-abhängigen TGF- β -Signalweges erfolgt.

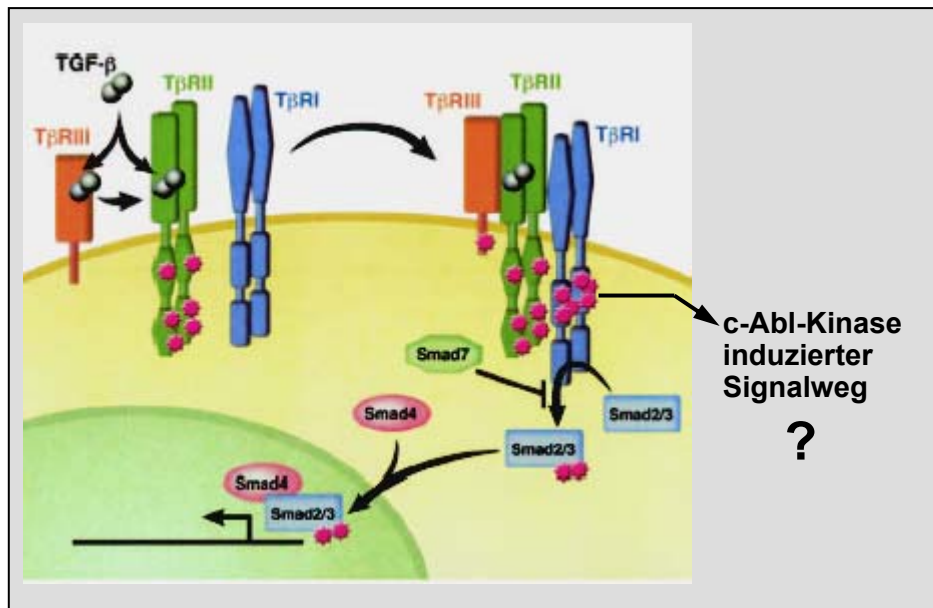


Abb. 21: Der TGF-β-Weg⁹⁴. TGF-β bindet an TGF-β Typ II-Rezeptoren. Nachfolgend rekrutiert dieser Komplex TGF-β Typ I-Rezeptoren. Diese Bindung führt zur Phosphorylierung und Aktivierung des Rezeptorkomplexes, was wiederum die Phosphorylierung von Smad2/3 nach sich zieht. Phosphoryliertes Smad2/3 bildet mit Smad4 einen Komplex aus, der im Zellkern zur Aktivierung der Zielgene führt⁹⁴. Eine Aktivierung des c-Abl-Signalweges durch TGF-β ist beschrieben, jedoch ist der zu Grunde liegende Mechanismus noch nicht geklärt⁹⁶.

6.5 Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit legen eine gesteigerte Aktivierung des PDGF/PDGFR-Systems im Prozess der myokardialen Fibrose nahe, ausgelöst durch eine von der CVB3-Infektion unterhaltenden Entzündung. Durch Behandlungen mit dem Tyrosinkinase-Hemmstoff STI571/Glivec ist eine Reduzierung der CVB3-induzierten myokardialen Fibrosierung, ohne Einfluss auf die Virusreplikation auszuüben, erkennbar. Weiterführende Untersuchungen könnten zusätzliche Einblicke in die Effizienz des Wirkstoffes STI571 und dessen Bedeutung für therapeutische Ansätze geben:

1. Im Hinblick auf die Modalitäten des Behandlungszeitraumes, sind bisher Untersuchungen bis 21. Tag p. i. vorgenommen worden. Eine Bestätigung der Wirksamkeit des STI571 zur Abschwächung der myokardialen Fibrosierung könnte in einem verlängerten Behandlungszeitraum, z. B. bis zum 35. Tag p. i. (späte chronische Phase) erzielt werden.
2. Die Untersuchung des Kollagenanteils im Myokardgewebe mittels biochemischen Hydroxyprolinbestimmung wäre neben der quantitativen Siriusrot-Auswertung eine weitere Methode, die Verringerung der Myokard Fibrosierung durch STI571 direkt im Gewebe zu analysieren²⁵⁴.

Zur Klärung der Beteiligung einer Hemmung des TGF- β /c-Abl-Weges an der beobachteten antifibrotischen Wirkung von STI571 wäre es denkbar:

1. Alternative Strategien zur Blockade des PDGFR-Systems einzusetzen, die den c-Abl-Weg nicht beeinflussen, z. B. durch den Einsatz des Hemmstoffes AG1295, ein Chinoxalin-Derivat, das im Tiermodell der Ratte die Ausbildung der Nierenfibrose signifikant abschwächt.
2. Vergleichend eine selektive Hemmung des TGF- β /TGF- β -Rezeptor-Systems hinsichtlich seiner Auswirkung auf die Fibrosierung in diesem Modell zu prüfen. Hierfür käme z. B. der Einsatz von nicht-Tyrosinkinase-Inhibitoren, wie z.B. AG1879 oder TGF- β -RII transgenen Mäusen in Frage.

Trotz der positiven Wirksamkeit des STI571 konnte eine komplette Ausheilung der CVB3-induzierten Fibrose in MHC Klasse II knockout Mäusen nicht beobachtet werden. Daraus kann abgeleitet werden, dass das PDGF/PDGFR-System nicht der alleinige Faktor bei der Ausbildung von Bindegewebsvermehrung ist. Möglichkeiten hinsichtlich weiterer Versuchsansätze zur Verminderung von Fibrose in diesem Mausmodell könnten auf folgenden Ebenen bestehen:

1. Die Prüfung der Rollen anderer Zytokine (TGF- β und TNF- α) in diesem Krankheitsbild, durch geeignete Inhibierungsstrategien.
2. Die chronische Viruspersistenz im Myokard ist vermutlich kritisch für den Unterhalt einer Myokarditis. Damit ist die Viruselimination eine wichtige Strategie hinsichtlich einer kausalen Therapie. Versuche an MHC Klasse II knockout Mäusen zeigten auf diesem Gebiet bereits gute Ergebnisse, wenn die Mäuse mit anti-CVB3-IgG-haltigem Serum von CVB3-infizierten immunkompetenten C57BL/6 Mäusen behandelt wurden. Die MHC Klasse II knockout Mäuse weisen mit dieser Behandlung 21 Tage nach CVB3-Infektion eine Eliminierung des Virus im Myokard auf, ebenso können nur noch kleine, vereinzelte Infiltrate im Myokard gefunden werden. Allerdings lassen sich im Herzgewebe dieser Mäuse noch Spuren von Fibrose nachweisen. Eine Kombinationsbehandlung mit IgG-haltigem Serum und STI571 könnte vielleicht dazu führen, dass eine komplette Ausheilung des Myokards von immundefizienten Mäusen möglich wäre.

Die Beteiligung des PDGF/PDGFR-System in anderen entzündlichen Geweben ist mehrfach belegt. Eigene Vorversuche an Mäusen und Literaturdaten von Patienten²⁵⁵ belegen stark positive PDGF-C- und PDGF-D-Signale in der Rheumatoiden Arthritis in den Knorpel- und Knochendestruktionen. Eine Verbesserung des Krankheitsbildes könnte durch eine lokal applizierte Behandlung mit dem Tyrosinkinase-Hemmstoff STI571 führen. Gleichzeitig würde sich damit ein weiteres humanes Einsatzgebiet für diesen Wirkstoff erschließen.

7. Literaturverzeichnis

1. Zell R. Molekulare Diversität der Picornaviren. *Ärzteblatt Thüringen*. 2002;13:418-420.
2. Stelzner A, Stein F. Coxsackie-, Echo- und andere humanpathogene Non-Polio-Enteroviren. In: Adam D, Doerr HW, Link H, Loge H, Hrsg. *Die Infektologie*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag. 2004:873-877.
3. King A, Brown F, Christian P, Hovi T, Hyypiä T, Knowles N, Lemon S, Minor P, Palmberg A, Skern T, Stanway G. Picornaviridae. In: Van Regenmortel MH, Fauquet CM, Bishop DH, Calisher CD, Carsten EB, Estes MK, Lemon SM, Maniloff J, Mayo MA, McGeoch DJ, Pringle CR, Wicker RB. Hrsg. *Virus Taxonomy Seventh Report of the International Committee for the Taxonomy of Viruses*. New York, San Diego: Academic Press. 2000:657-673.
4. Fauquet C, Mayo M, Maniloff J, Desselberger U, Ball L. Picornaviridae. In "Virus Taxonomy. Eight Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Academic Press, New York, San Diego*. 2005:pp757.
5. Dalldorf G, Sickles G. An unidentified, filterable agent isolated from the feces of children with paralysis. *Science*. 1948;108:61-62.
6. Dalldorf G. The Coxsackie viruses. *Bull. N. Y. Acad. Med.* 1950;26:329-335.
7. Minor P, Brown F, Domingo E, Hoey E, King A, Knowles N, Lemon S, Palmenberg A, Rückert R, Stanway G, Wimmer E, Yin-Murphy M. Picornaviridae. In: "Virus Taxonomy. Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses". Murphy FA, Fauquet CM, Bishop DHL, Ghabrial SA, Jarvis AW, Martelli GP, Mayo MA, Summer MD (Eds.). *Springer Verlag, Wien, New York*. 1995:pp329-336.
8. Schmidtke M, Selinka H, Heim A, Jahn B, Tonew M, Kandolf R, Stelzner A, Zell R. Attachment of coxsackievirus B3 variants to various cell lines: mapping of phenotypic differences to capsid protein VP1. *Virology*. 2000;275:77-88.
9. Zautner A, Korner U, Henke A, Badorff C, Schmidtke M. Heparan sulfates and coxsackievirus-adenovirus receptor: each one mediates coxsackievirus B3 PD infection. *Virology*. 2003;77:10071-10077.
10. Bergelson J, Chan M, Solomon K, St John N, Lin H, Finberg R. Decay-accelerating factor (CD55), a glycosylphosphatidyl-inositol-anchored complement regulatory protein, is a receptor for several echoviruses. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994;91:6245-6249.
11. Shafren D, Bates R, Agrez M, Herd R, Burns G, Barry R. Coxsackievirus B1, B3, and B5 use decay accelerating factor as a receptor for cell attachment. *J Virol*. 1995;69:3873-3877.
12. Bergelson J, Cunningham J, Droguett G, Kurt-Jones E, Krithivas A, Hong J, Horwitz M, Crowell R, Finberg R. Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science*. 1997;275:1320-1323.
13. Perez L, Carrasco L. Entry of poliovirus into cells does not require a low-pH step. *J Virol*. 1993;67:4543-4548.
14. Kitamura N, Semler B, Rothberg P, Larsen G, Adler C, Dorner A, Emini E, Hanecak R, Lee J, van der Werf S, Anderson C, Wimmer E. Primary structure, gene organization and polypeptide expression of poliovirus RNA. *Nature*. 1981;291:547-553.
15. Toyoda H, Nicklin M, Murray M, Anderson C, Dunn J, Studier F, Wimmer E. A second virus-encoded proteinase involved in proteolytic processing of poliovirus polyprotein. *Cell*. 1986;45:761-770.
16. Kandolf R. Enteroviral myocarditis and dilated cardiomyopathy. *Med Klin*. 1998;93:215-222.
17. Zell R, Görlach M. Die Rolle von RNA-Signalstrukturen im Replikationszyklus von Enteroviren. In: Zell R, Henke A, Stelzner A, Hrsg. *Aspekte der Enterovirus-Forschung*. Jena. 2002:21-37.

18. Bedard K, Semler B. Regulation of picornavirus gene expression. *Microbes Infect.* 2004;6:702-713.
19. Melnick J. Enteroviruses: polioviruses, coxsackieviruses, echoviruses and newer enteroviruses. In: *Fields BN, Knipe DM, Howley PM (Eds.), Virology 3rd edition. Philadelphia: Lippincott-Raven Publisher.* 1996:665-721.
20. Baboonian C, Davis M, Booth J, McKenna W. Coxsackie B viruses and human heart disease. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1997;223:31-52.
21. Chapman K, Tracy S, Gauntt C. An infectious cDNA copy of the genome of a non-cardiovirulent coxsackievirus B3 strain: a complete sequence analysis and comparison of the genome of cardiovirulent coxsackievirus. *Arch Virol.* 1994;135:p115-130.
22. Tu Z, Chapman K, Hufnagel G, Tracy S, Romero J, Barry W, Zahao L, Currey K, Shapiro B. The cardiovirulent phenotype of coxsackievirus B3 is determined at a single site in the genomic 5' nontranslated region. *J Virol.* 1995;69:4607-4618.
23. Feuer R, Mena I, Pagarian R, Harkins S, Hassett D, Whitton J. Coxsackievirus B3 and the neonatal CNS: the roles of stem cells, developing neurons, and apoptosis in infection, viral dissemination, and disease. *Am J Pathol.* 2003;163:1379-1393.
24. Huber S. Increased susceptibility of male BALB/c mice to coxsackievirus B3-induced myocarditis: role for CD1d. *Med Microbiol Immunol (Berl).* 2004;Elektronische Publikation.
25. Kandolf R, Klingel K, Zell R, Canu U, Fortmüller U, Hohenadle C, Albrecht M, Reinmann B, Franz W, Heim A. Molecular mechanisms in the pathogenesis of enteroviral heart disease: acute and persistent infections. *Clin Immunol.* 1993;68:153-158.
26. Kim K, Hufnagel G, Chapman N, Tracy S. The group B coxsackievirus and myocarditis. *Rev Med Virol.* 2001;11:355-368.
27. Calabrese F, Thiene G. Myocarditis and inflammatory cardiomyopathy: microbiological and molecular biological aspect. *Cardiovascular Research.* 2003;60:11-25.
28. Modlin J, Rotbart H. Group B coxsackie disease in children. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1997;223:53-80.
29. Bendig J, Franklin O, Hebden A, Backhouse P, Clewley J, Goldman A, Piggott N. Coxsackievirus B3 sequences in the blood of a neonate congenital myocarditis plus serological evidence of maternal infection. *J Med Virol.* 2003;70:606-609.
30. Kaplan M, Klein S, McPhee J, Harper R. Group B coxsackievirus infections in infants younger than three months of age: a serious childhood illness. *Rev Infect Dis.* 1983;5:1019-1032.
31. Kandolf R, Hofschneider P. Molecular cloning of the genome of a cardiotropic Coxsackie B3 virus: full-length reverse-transcribed recombinant cDNA generates infectious virus in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1985;82:4818-4822.
32. Melnick J, Ledinko N. Immunological reactions of the Coxsackie viruses. I. The neutralization test; technic and application. *J Exp Med.* 1950;92:463-482.
33. Klingel K, Sauter M, Bock C, Szalay G, Schorr J, Kandolf R. Molecular pathology of inflammatory cardiomyopathy. *Med Microbiol Immunol (Berl).* 2004;193:101-107.
34. Maisch B. Classification of cardiomyopathies according to the WHO/ISFC Task Force-more question than answers? *Med Klin (Munich).* 1998;93:199-209.
35. Sigusch H, Reinhardt D, Surber R, Figulla H. Myokarditis und virusassoziierte dilatative Kardiomyopathie: die Jenaer Perspektive. In: *Zell R, Henke A, Stelzner A, Hrsg. Aspekte der Enterovirus-Forschung. Jena.* 2002:90-99.

36. Aretz H. Myokarditis: the Dallas criteria. *Hum Pathol.* 1987;18:619-624.
37. Aretz H, Billingham M, Edwards W, Factor S, Fallon J, Fenoglio jr. J, Olsen E, Schoen F. A histopathologic definition and classification. *Am J Cardiovasc Pathol.* 1987;1:3-14.
38. Strauer B, Kandolf R, Mall G, Maisch B, Mertens T, Figulla H, Schwartzkopff B, Brehm M, Schultheiss H. Update 2001. Myocartits--Cardiomyopathy. *Med Klin (Munich).* 2001;96:608-625.
39. Maisch B, Portig I, Ristic A, Hufnagel G, Pankuweit S. Definition of inflammatory cardiomyopathy (myocarditis): on the way to consensus. A status report. *Herz.* 2000;25:200-209.
40. Feldmann A, McNamara D. Myocarditis. *N Engl J Med.* 2000;343:1388-1398.
41. Whitton J, Feuer R. Myocarditis, Microbes and Autoimmunity. *Autoimmunity.* 2004;37:375-386.
42. Pankuweit S, Portig I, Maisch B. Pathophysiology of Cardiac Inflammation: Molecular Mechanisms. *Herz.* 2002;27:669-676.
43. Schultheiss H, Kühl U. Myocarditis and inflammatory cardiomyopathy. In: Crawford MH, DiMarco JP, Hrsg. *Cardiology. London, Edinburgh, New York, Philadelphia, St.Louis, Sydney, Toronto: Mosby International Ltd.* 2001.
44. Neumann T, Ross B, Hengge U, Gerken G, Erbel R. Cardiac manifestations in HIV-infected individual. *Med Klin (Munich).* 2002;97:659-665.
45. Bowles N, Ni J, Kearney D, Pauschinger M, Schultheiss H, McCarthy R, Hare J, Bricker J, Bowles K, Towbin J. Detection of viruses in myocardial tissue by polymerase chain reaction, evidence of adenovirus as a common cause of myocarditis in children and adults. *J Am Coll Cardiol.* 2003;42:466-472.
46. Pankuweit S, Portig I, Eckhardt H, Crombach M, Hufnagel G, Maisch B. Prevalence of viral genome in endomyocardial biopsies from patients with inflammatory heart muscle disease. *Herz.* 2000;25:221-226.
47. Lotze U, Egerer R, Tresselt C, Glück B, Danberg G, Stelzner A, Figulla H. Frequent detection of parvovirus B19 genome in the myocardium of adult patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Med Microbiol Immunol (Berl).* 2004;193:75-82.
48. Schultheiss H, Pauschinger M, Kühl U. Pathogenesis of inflammatory cardiomyopathies. *Med Klin (Munich).* 1998;93:229-235.
49. Leonard E. Viral myocarditis. *Pediatr Infect Dis J.* 2004;23:665-666.
50. Gauntt D, Huber S. Coxsackievirus Experimental Heart Diseases. *Front Biosci.* 2003;8:e23-35.
51. Whitton J. Immunopathology during coxsackievirus infection. *Springer Semin Immunopathol.* 2002;24:201-213.
52. Badorff T, Lee G, Lamphcar B, ME. M, Campbell K, Rhoads R, Knowlton K. Enteroviral protease 2A cleaves dystrophin: evidence of cytoskeletal disruption in an acquired cardiomyopathy. *Nat Med.* 1999;5:320-326.
53. Knowlton K, Badorff C. The immune system in viral myocarditis: maintaining the balance. *Circ Res.* 1999;85:559-561.
54. 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. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992;89:314-318.
55. Kandolf R. The molecular pathogenesis of enterovirus myocarditis. Virus persistence and chronic inflammation. *Internist (Berl)*. 1995;36:430-438.
56. Kühl U, Pauschinger M, Noutsias M, Kapp J, Schultheiss H. Diagnosis and treatment of patients with virus induced inflammatory cardiomyopathy. *Eur Heart J Supplements*. 2002;4:173-180.
57. Manolio T, Baughmann K, Rodeheffer R, Pearson T, Bristow J, Michels V, Abelman W, Harlan W. Prevalence and etiology of idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J Cardiol*. 1992;69:1458-1466.
58. Maisch B, Ristic A, Hufnagel G, Funck R, Alter P, Tontsch D, Pankuweit S. Dilated cardiomyopathies as a cause of congestive heart failure. *Herz*. 2002;27:113-114.
59. Pauschinger M, Chandrasekharan K, Li J, Schwimmbeck P, Noutsias M, Schultheiss H. Mechanisms of extracellular matrix remodeling in dilated cardiomyopathy. *Herz*. 2002;27:677-682.
60. Glück B, Schmidtke M, Merkle I, Stelzner A, Gerns D. Persistent expression of cytokines in the chronic stage of CVB3-induced myocarditis in NMRI mice. *J Mol Cell Cardiol*. 2001;33:1615-1626.
61. Shioi T, Matsumori A, Sasayama S. Persistent expression of cytokine in the chronic stage of viral myocarditis in mice. *Circulation*. 1996;94.
62. Matsumori A. Cytokines in myocarditis and dilated cardiomyopathy. *Eur Heart J Supplements*. 2002;4:142-145.
63. Satoh M, Tamura G, Seawa I, Tashiro A, Hiramori K, Satodate R. Expression of cytokine gene and presence of enteroviral genomic RNA in endomyocardial biopsy tissue of myocarditis and dilated cardiomyopathy. *Virchows Arch*. 1996;427:503-509.
64. Satoh M, Tamura G, Segawa I, Hiramori K, Satodate R. Enteroviral RNA in dilated cardiomyopathy. *Eur Heart J*. 1994;15:934-939.
65. Henke A, Huber S, Stelzner A, Whitton J. The role of CD8+ T lymphocytes in coxsackievirus B3-induced myocarditis. *J Virol*. 1995;69:6720-6728.
66. Merkle I, Tonew M, Glück B, Schmidtke M, Egerer R, Stelzner A. Coxsackievirus B3-induced chronic myocarditis in outbred NMRI mice. *J Hum Virol*. 1999;2:369-379.
67. Glück B, Merkle I, Dornberger G, Stelzner A. Expression of inducible nitric oxide synthase in experimental viral myocarditis. *Herz*. 2000;25:225-260.
68. Huber S, Graveline D, Newell M, Born W, O'Brien R. V gamma 1+T cells suppress and V gamma 4+T cells promote susceptibility to coxsackievirus B3-induced myocarditis in mice. *J Immunol*. 2000;165:4174-4181.
69. Klingel K, Schnorr J, Sauter M, Szalay G, Kandolf R. beta2-microglobulin-associated regulation of interferon-gamma and virus-specific immunoglobulin G confer resistance against the development of chronic coxsackievirus myocarditis. *Am J Pathol*. 2003;162:1705-1720.
70. Leipner C, Grün K, Schneider I, Glück B, Sigusch H, Stelzner A. Coxsackievirus B3-induced myocarditis: differences in the immune response of C57BL/6 and Balb/c mice. *Med Microbiol Immunol (Berl)*. 2004;193:141-147.
71. Leipner C, Borchers M, Merkle I, Stelzner A. Coxsackievirus B3-induces myocarditis in MHC class II-deficient mice. *J Hum Virol*. 1999;2:102-114.

72. Merkle I, Leipner C. Murine Coxsackievirus-Infektionen als Modell der menschlichen Myokarditis. In: Zell R, Henke A, Stelzner A, Hrsg. *Aspekte der Enterovirus-Forschung*. Jena. 2002;38-44.
73. Chow L, Gauntt C, McManus B. Differential effects of myocarditis variants of Coxsackievirus B3 in inbred mice. *Lab Invest*. 1991;64:55-64.
74. Kandolf R, Sauter M, Aepinus C, Schnorr J, Selinka H, Klingel K. Mechanisms and consequences of enterovirus persistence in cardiac myocytes and cells of the immune system. *Virus Res*. 1999;62:149-158.
75. Schmidtke M, Glück B, Merkle I, Hofmann P, Stelzner A, Gemsa D. Cytokine profile in heart, spleen, and thymus during the acute stage of experimental coxsackievirus B3-induced chronic myocarditis. *J Med Virol*. 2000;61:518-526.
76. Kawabe T, Naka T, Yoshida K, Tanaka T, Fujiwara H, Suematsu S, Yoshida N, Kishimoto T, Kikutani H. The immune response in CD40-deficient mice: Impaired immunoglobulin class switching and germinal center formation. *Immunity*. 1994;1:167-178.
77. Schneider I, Grün K, Stelzner A, Leipner C. CD40 immunodeficient mice are prone to chronic myocarditis after infection with coxsackievirus B3. *Immunobiology*. 2001;204:168-169.
78. Kopf M, Gros G, Bachman M, Lamers M, Blüthman H, Köhler G. Disruption of murine IL-4 blocks Th2 cytokine responses. *Nature*. 1993;362:254-248.
79. Leipner C, Grün K, Borchers M, Stelzner A. The outcome of coxsackievirus B3-(CVB3-) induced myocarditis is influenced by the cellular immune status. *Herz*. 2000;25:245-248.
80. Grün K, Stelzner A, Leipner C. Cytokine mRNAs expressed in murine hearts suffering from Coxsackievirus B3-induces myocarditis. *Immunobiology*. 2000;203:319.
81. Kitamura D, Rajewsky K. Targeted disruption of mu chain membrane exon causes loss of heavy-chain allelic exclusion. *Nature*. 1992;356:154-156.
82. Leipner C. Die Modulation der Coxsackievirus-B3-Infektion durch das adaptive Immunsystem. In: Zell R, Henke A, Stelzner A, Hrsg. *Aktuelle Aspekte der Enterovirus-Forschung*. Jena. 2002:56-68.
83. Köntgen F, Suess G, Stewart C, Steinmetz M, Bluethmann H. Targeted disruption of the MHC class II Aa gene in C57BL/6 mice. *Int Immunol*. 1993;8:957-964.
84. Ross M, Romrell L, Kaye G. *Histology*. 3rd ed. Philadelphia, London: Williams and Wilkins. 1995.
85. Camelliti P, Borg T, Kohl P. Structural and functional characterisation of cardiac fibroblast. *Cardiovascular Research*. 2004;65:40-51.
86. Manabe I, Shindo T, Nagai R. Gene Expression in Fibroblast and Fibrosis: Involvement in Cardiac Hypertrophy. *Circulation Research*. 2002;91:1103-1113.
87. Tomasek J, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown R. Myofibroblast and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Bio*. 2002;3:349-363.
88. Werner S, Grose R. Regulation of Wound Healing by Growth Factors and Cytokines. *Physiol Rev*. 2003;83:835-870.
89. Bonner J. Regulation of PDGF and its receptors in fibrotic diseases. *Cytokine and Growth Factor Reviews*. 2004;15:255-273.
90. Singer A, Clark R. Cutaneous wound healing. *N Engl J Med*. 1999;341:738-746.

91. Gabbiani G. Biologische Eigenschaften von Myofibroblasten. *Hartmann WundForum*. 1996;1/96:17-19.
92. Bauer E, Cooper T, Huang J, Altman J, Deuel T. Stimulation of in vitro human skin collagenase expression by platelet-derived growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1985;82:4132-4136.
93. Bartram U, Speer C. The role of transforming growth factor beta in lung development and disease. *CHEST*. 2004;125:754-765.
94. Elliott R, Blobe G. Role of transforming growth factor beta in human cancer. *J of Clinic Oncol*. 2005;23:2078-2093.
95. Daniels C, Wilkes M, Edens M, Kottom T, Murphy S, Limper A, Leof E. Imatinib mesylate inhibits the profibrogenic activity of TGF-beta and prevents bleomycin-mediated lung fibrosis. *J Clin Invest*. 2004;114:1308-1316.
96. Wang S, Wilkes M, Leof E, Hirschberg R. Imatinib mesylate blocks a non-Smad TGF-beta pathway and reduces renal fibrogenesis in vivo. *FASEB J*. 2005;19:1-11.
97. Wynn T. Fibrotic disease and the TH1/TH2 paradigm. *Nature Reviews Immunobiology*. 2004;4:583-594.
98. Wessely R, Henke A, Zell R, Kandolf R, Knowlton K. Low-level expression of a mutant coxsackieviral cDNA induces a myocytopathic effect in culture: an approach to the study of enteroviral persistence in cardiac myocytes. *Circulation*. 1998;98:450-457.
99. Wessely R, Klingel K, Santana L, Dalton N, Hongo M, Jonathan-Lederer W, Kandolf R, Knowlton K. Transgenic expression of replication-restricted enteroviral genomes in heart muscle induces defective excitation-contraction coupling and dilated cardiomyopathy. *J Clin Invest*. 1998;102:1444-1453.
100. Neu N, Beisel K, Traystman M, Pose N, Craig S. Autoantibodies specific for the cardiac myosin isoform are found in mice susceptible to Coxsackievirus B3-induced myocarditis. *J Immunol*. 1987;138:2488-2492.
101. Caforio A, Mahon N, McKenna W. Cardiac autoantibodies to myosin and other heart-specific autoantigens in myocarditis and dilated cardiomyopathy. *Autoimmunity*. 2001;34:199-204.
102. Neu N, Rose N, Beisel K, Herskowitz A, Gurri-Glass G, Craig S. Cardiac myosin induces myocarditis in genetically predisposed mice. *J Immunol*. 1987;139:3630-3636.
103. Eriksson U, Kurrer M, Sebald W, Brombacher F, Kopf M. Dual role of the IL-12/IFN-gamma axis in the development of autoimmune myocarditis: Induction by IL-12 and protection by IFN-gamma. *J Immunol*. 2001;167:5464-5469.
104. Kubota T, McTiernan C, Frye C, Demetris A, Feldman A. Cardiac-specific overexpression of tumor necrosis factor-alpha causes lethal myocarditis in transgenic mice. *J Card Fail*. 1997;3:117-124.
105. Kubota T, McTiernan C, Frye C, Slawson S, Lemster B, Koretsky A, Demetris A, Feldman A. Dilated cardiomyopathy in transgenic mice with cardiac-specific overexpression of tumor necrosis factor-alpha. *Circ Res*. 1997;81:627-635.
106. Brynat D, Becker L, Richardson J, Shelton J, Franco F, Peshock R, Thompson M, Giroir B. Cardiac failure in transgenic mice with myocardial expression of tumor necrosis factor-alpha. *Circulation*. 1998;97:1375-1381.
107. Huang W, Aramburu J, Douglas P, Izumo S. Transgenic expression of green fluorescence protein can cause dilated cardiomyopathy. *Nat Med*. 2000;6:482-483.

108. Isoda K, Kamezawa Y, Tada N, Sato M, Ohsuzu F. Myocardial hypertrophy in transgenic mice overexpressing human interleukin 1 α . *J Card Fail.* 2001;7:355-364.
109. Ponten A, Li X, Thoren P, Aase K, Sjöblom T, Östman A, Eriksson U. Transgenic overexpression of platelet-derived growth factor-C in the mouse heart induces cardiac fibrosis, hypertrophy, and dilated cardiomyopathy. *Am J Pathol.* 2003;163:673-682.
110. Campell J, Hughes S, Gilbertson D, Palmer T, Holdren M, Haran A, Odell M, Bauer R, Ren H, Haugen H, Yeh M, Fausto N. Platelet-derived growth factor C induces liver fibrosis, steatosis, and hepatocellular carcinoma. *PNAS.* 2005;102:3389-3394.
111. Seeland U, Haeuseler C, Hinrichs R, Rosenkranz S, Pfitzner T, Scharffetter-Kochanek K, Böhm M. Myocardial fibrosis in transforming growth factor-beta(1) (TGF-beta(1)) transgenic mice is associated with inhibition of interstitial collagenase. *Eur J Clin Invest.* 2002;32:295-303.
112. Ross R, Glomset J, Kariya B, Harker L. A platelet-dependent serum factor that stimulates the proliferation of arterial smooth muscle cells in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1974;71:1207-1210.
113. Ross R, Raines E, Bowen-Pope D. The biology of platelet-derived growth factor. *Cell.* 1986;46:155-169.
114. Aase K, Abramsson A, Karlsson L, Betzholtz C, Eriksson U. Expression analysis of PDGF-C in adult and developing mouse tissues. *Mech Dev.* 2002;110:187-191.
115. Gilbertson D, Duff M, West J, Kelly J, Sheppard P, Hofstrand P, Gao Z, Shoemaker K, Bukowski T, Moore M, Feldhaus A, Humes J, Palmer T, Hart C. Platelet-derived growth factor C (PDGF-C), a novel growth factor that binds to PDGF alpha and beta receptor. *J Biol Chem.* 2001;276:27406-27414.
116. Heldin C, Westermark B. Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiol Rev.* 1999;79:1283-1316.
117. LaRochelle W, Jeffers M, McDonald W, Chillakuru R, Giese N, Lokker N, Sullivan C, Boldog F, Yang M, Vernet C, Burgess C, Fernandes E, Deegler L, Rittman B, Shimkets J, Shimkets R, Rothberg J, Lichtenstein H. PDGF-D, a new protease-activated growth factor. *Nature Cell Biology.* 2001;3:517-521.
118. Bergsten E, Uutela M, Li X, Pietras K, Östman A, Heldin C, Alitalo K, Eriksson U. PDGF-D is a specific, protease-activated ligand for the PDGF beta receptor. *Nat Cell Biol.* 2001;3:512-516.
119. Östman A, Backström G, Fong N, Betzholtz C, Wernstedt C, Hellman U, Westermark B, Valenzuela P, Heldin C. Expression of three recombinant homodimeric isoforms of PDGF in *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for difference in receptor binding and functional activities. *Growth Factors.* 1989;1:271-281.
120. Betzholtz C, Johnsson A, Heldin C, Westermark B, Lind P, Ureda M, Eddy R, Shows T, Philpott K, Mellor A, Knott T, Scott J. cDNA sequence and chromosomal localization of human platelet-derived growth factor A-chain and its expression in tumor cell lines. *Nature.* 1986;320:695-699.
121. Li X, Ponten A, Aase K, Karlsson L, Abramsson A, Uutela M, Backström G, Hellström M, Boström H, Li H, Soriano P, Betsholtz C, Heldin C, Alitalo K, Östman A, Eriksson U. PDGF-C is a new protease-activated ligand for the PDGF alpha-receptor. *Nat Cell Biol.* 2000;2:302-309.
122. Dijkmans J, Xu J, Masure S, Dhanaraj S, Gosiewska A, Geesin J, Sprengel J, Harris S, Verhasselt P, Gordon R, Yon J. Characterization of platelet-derived growth factor-C (PDGF-C): expression in normal and tumor cells, biological activity and chromosomal localization. *The Int J of Biochem & Cell Biol.* 2002;34:414-426.

123. Uutela M, Lauren J, Bergsten E, Li X, Horelli-Kuitunen N, Eriksson U, Alitalo K. Chromosomal localisation, exon structure, and vascular expression patterns of the human PDGFC and PDGFC genes. *Circulation*. 2001;103:2242-2247.
124. Claesson-Welsh L. Mechanism of action of platelet-derived growth factor. *Int J Biochem Cell Biol*. 1996;28:373-385.
125. Heldin C, Östman A, Rönstrand L. Signal-transduction via platelet-derived growth factors. *Biochim Biophys Acta-Rev. Cancer*. 1998;1378:F79-113.
126. Spritz R, Strunk K, Lee S, Lu-Kuo J, Ward D, LePaslier D, Altherr M, Dorman T, Moir D. A YAC contig spanning a cluster of human type III receptor protein tyrosin kinase genes (PDGFRA-KIT-KDR) in chromosome segment 4q12. *Genomic*. 1994;22.
127. Yarden Y, Escobedo J, Kuang W, Yang-Feng T, Daniel T, Tremble P, Chen E, Ando M, Harkins R, Francke U, Friend V, Ullrich A, Williams L. Structure of the receptor for platelet-derived growth factor helps define a family of closely related growth factor receptor. *Nature*. 1986;323:226-232.
128. Heidarman M, Pierce J, Jensen R, Matsui T, Aaronson S. Chimeric alpha-and-beta-platelet-derived growth factor (PDGF) receptors define three immunoglobulin-like domain of the alpha-PDGF receptor that determine PDGF-AA binding specificity. *J Biol Chem*. 1990;265:18741-18744.
129. Ullrich A, Schlessinger J. Signal transduction by receptors with tyrosin kinase activity. *Cell*. 1990;20:203-212.
130. Westermark B, Claesson-Welsh L, Heldin C. Structural and functional aspects of the receptors for platelet-derived growth factor. *Prog Growth Factor Res*. 1989;1:253-266.
131. Li X, Eriksson U. Novel PDGF family members: PDGF-C and PDGF-D. *Cytokine and Growth Factor Reviews*. 2003;14:91-98.
132. Fredriksson L, Li H, Eriksson U. The PDGF family: four gene products form five dimeric isoforms. *Cytokine and Growth Factor Reviews*. 2004;15:197-204.
133. Ding H, Wu X, Boström H, Kim I, Wong N, Tsoi B, O'Rourke M, Koh G, Soriano P, Betzholtz C, Hart T, Marazita M, Field K, Tam P, Nagy A. A specific requirement for PDGF-C in platelet formation and PDGFR-alpha signaling. *Nature Genetics*. 2004;36:1111-1116.
134. Betzholtz C, Karlsson L, Lindahl P. Developmental roles of platelet-derived growth factors. *Bioessays*. 2001;23:494-507.
135. Hoch R, Soriano P. Roles of PDGF in animal development. *Development*. 2003;130:4769-4784.
136. Lindahl P, Johansson B, Leveen P, Betzholtz C. Pericyte loss and microaneurysm formation in PDGF-B-deficient mice. *Science*. 1997;277:242-252.
137. Leveen P, Pakny M, Gebre-Medhin S, Swolin B, Larsson E, Betzholtz C. Mice deficient for PDGF-b show renal, cardiovascular, and hematological abnormalities. *Genes Dev*. 1994;8:1875-1887.
138. Soriano P. Abnormal kidney development and hematological disorders in PDGF beta-receptor mutant mice. *Genes Dev*. 1994;8:1888-1896.
139. Bostrom H, Willetts K, Pekny M, Leveen P, Lindahl P, Hedstrand H, Pekna M, Hellstöm M, Gebre-Medhin S, Schalling M, Nilsson M, Kurland S, Tornell J, Heath J, Betzholtz C. PDGF-A signaling is a critical event in lung alveolar myofibroblast development and alveogenesis. *Cell*. 1996;85:863-873.

140. Soriano P. The PDGFalpha receptor is required for neural crest cell development and for normal patterning of the somites. *Development*. 1997;124:2691-2700.
141. Betzholtz C, Raines E. Platelet-derived growth-factor -a key regulator of connective-tissue cells in embryogenesis and pathogenesis. *Kidney Int*. 1997;51:1361-1369.
142. Yi E, Lee H, Ying S, Piquet P, Sarosi I, Kaufmann S, Tarpley J, Wang N, Ulrich T. Platelet-derived growth factor causes pulmonary cell proliferation and collagen deposition in vivo. *Am J Pathol*. 1996;149:539-548.
143. Tang W, Ulrich T, Lacey D, Hill D, Qi M, Kaufman S, Van G, Tarpley J, Yee J. Platelet-derived growth factor-BB induced renal tubulointerstitial myofibroblast formation and tubulointerstitial fibrosis. *Am J Pathol*. 1996;148:1169-1180.
144. Ludwicka A, Ohba T, Trojanowska M, Yamakage A, Strange C, Smith E, Leroy E, Sutherland S, Silver R. Elevated levels of platelet-derived growth factor and transforming growth factor-beta 1 in bronchoalveolar lavage fluid from patients with scleroderma. *J Rheumatol*. 1995;22:1876-1883.
145. Liu J, Morris G, Lei W, Hart C, Lasky J, Brody A. Rapid activation of PDGF-A and -B expression at sites of lung injury in asbestos-exposed rats. *Am J Resp Cell&Mol Biol*. 1997;17:129-140.
146. Lasky J, Tonthat B, Liu J, Friedman M, Brody A. Upregulation of the PDGF-alpha receptor precedes asbestos-induced lung fibrosis in rats. *Am J Resp Critical Care Med*. 1998;157:1652-1657.
147. Johnson R, Raines E, Floege J, Yoshimura A, Pritzl P, Alpers C, Ross R. Inhibition of mesangial cell proliferation and matrix expansion in glomerulonephritis in the rats by antibody to platelet-derived growth factor. *J Exp Med*. 1992;175:1413-1416.
148. Ludwig D, Kosmehl H, Sommer M, Böhmer F, Stein G. PDGF receptor kinase blocker AG1295 attenuates interstitial fibrosis in rat kidney after unilateral obstruction. *Cell Tissue Res*. 2000;299:97-103.
149. McCartney F, Mizel D, Wong H, Wahl L, Wahl S. *Growth Factors*. 1990;4:27-35.
150. Silberstein F, De S, Levi G, Aloisi F. Cytokine-regulated expression of platelet-derived growth factor gene and protein in cultured human astrocytes. *J Neurochem*. 1996;66:1409-1417.
151. Lindroos P, Coin P, Osornio V, Bonner J. Interleukin 1beta (IL-1beta) and the IL-1beta-alpha 2-macroglobulin complex upregulate the platelet-derived growth factor alpha-receptor on rat pulmonary fibroblast. *Am J Resp Cell&Mol Biol*. 1995;13:455-465.
152. Phillips A, Steadman R, Topley N, Williams J. Elevated D-glucose concentration modulate TGF-beta1 synthesis by human cultured renal proximal tubular cells. The permissive role of platelet-derived growth factor. *Am J Pathol*. 1995;147:362-374.
153. Zhuo Y, Zhang J, Laboy M, Lasky J. Modulation of PDGF-C and PDGF-D expression during bleomycin-induced lung fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2004;286:182-188.
154. Eitner F, Ostendorf T, Kretzler M, Cohen C, Eriksson U, Grone H, Flöge J, ERCB-Consortium. PDGF-C expression in the developing and normal adult human kidney and in glomerular diseases. *J Am Soc Nephrol*. 2003;14:1145-1153.
155. Ostendorf T, van Reoyen C, Peterson J, Kunter U, Eitner F, Hamad A, Chan G, Jia X, Macaluso J, Grazit-Bornstein G, Keyt B, Lichtenstein H, LaRochelle W, Flöge J. A fully human monoclonal antibody (CR002) identifies PDGF-D as a novel mediator of mesangioproliferative glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol*. 2003;14:2237-2247.
156. Simm A, Nestler M, Hoppe V. Mitogenic effects of PDGF-AA on cardiac fibroblast. *J Mol Cell Cardiol*. 1997;29:357-368.

157. Omura T, Heldin C, Östmann A. Immunglobulin-like domain 4-mediated receptor-interaction contribute to platelet-derived growth factor-induced dimerization. *J Biol Chem*. 1997;272:12676-12682.
158. Levitzki A. PDGF receptor kinase inhibitors for the treatment of PDGF driven diseases. *Cytokine and Growth Factor Reviews*. 2004;14:229-235.
159. Levitzki A, Grazit A. Tyrosin-kinase inhibitions: an approach to drug development. *Science*. 1995;267:1782-1788.
160. Traxler P. Protein tyrosin kinase inhibitors in cancer treatment. *Expert Op Ther Pat*. 1997;7:571-588.
161. Mohammadi M, McMahon G, Sun L, Tang C, Hirth P, Yeh B, Hubbard S, Schlessinger J. Structures of the tyrosine kinase domain of fibroblast growth factor receptor in complex with inhibitors. *Science*. 1997;276.
162. Levitzki A, Böhmer F. Altered efficacy and selectivity of tyrosin kinase inhibitors of the activated states of protein tyrosin kinase. *Anti-Cancer Drug Design*. 1998;13:731-734.
163. Kovalenko M, Grazit A, Böhmer A, Rorsman C, Rönstrand L, Heldin C, Waltenberg J, Böhmer F, Levitzki A. Selective platelet-derived growth factor receptor kinase blocker reverse sis-transformation. *Cancer Res*. 1994;54:6106-6114.
164. Banai S, Wolf Y, Golomb G, Pearle B, Waltenberg J, Fishbein I, Schneider A, Grazit A, Perez L, Huber R, Lazarovich G, Rabinovich L, Levitzki A, Gertz S. PDGF-receptor tyrosin kinase blocker AG1295 selectively attenuates smooth muscle cell growth in vitro and reduces neointimal formation after balloon angioplasty in swine. *Circulation*. 1998;97:1960-1969.
165. Waltenberger J, Uecker A, Kroll J, Frank H, Mayr H, Bjorge J, Fujita G, Grazit A, Hombach V, Levitzki A, Böhmer F. A dual inhibitor for PDGF beta-receptor and scr kinase activity potently interferes with motogenic and mitogenic responses to PDGF in vascular smooth muscle cell. A novel candidate for prevention of vascular remodelling. *Circ Res*. 1998;85:12-22.
166. Bilder G, Krawiec J, McVety K, Grazit A, Gilon C, Lyall R, Zilberstein A, Levitzki A, Perrone M, Schreiber A. Tryphostins inhibit PDGF-induced DNA synthesis and associated early events in smooth muscle cells. *Am J Pathol*. 1991;260.
167. Bryckaert M, Eldor A, Fontenay M, Gazit A, Osherov N, Gilon C, Levitzki A, Tobelem G. Inhibition of platelet-derived growth factor-induced mitogenesis and tyrosine kinase activity in cultured bone marrow fibroblast by typhostins. *Exp Cell Res*. 1992;199:255-261.
168. Doll R, Dunn J, Bobko M, Singh B, Kuster J, Baizman E, Harris A, Sawutz D, Miller D, Wang S. 5,7-Dimethoxy-3-(4-pyridinyl)quinoline is a potent and selective inhibitor of human vascular beta-type platelet-derived growth factor receptor tyrosine kinase. *J Med Chem*. 1994;37:2627-2629.
169. Palmer BD SJ, Boyd M, Boschelli DH, Doherty AM, Hamby JM, Khatana SS, Kramer JB, Kraker AJ, Panek RL, Lu GH, Dahring TK, Winter RT, Showalter HD, Denny WA. Structure-activity relationships for 1-phenylbenzimidazoles as selective ATP site inhibitors of the platelet-derived growth factor receptor. *J Med Chem*. 1998;41:5457-5465.
170. Bilder G, Wentz T, Leadley R, Amin D, Byan L, O'Conner B, Needle S, Galczenski H, Bostwick J, Kasiewski C, Myers M, Spada A, Merkle L, Ly C, Persons P, Page K, Perrone M, Dunwiddie C. Restenosis following angioplasty in the swine coronary artery is inhibited by an orally active PDGF-receptor tyrosine kinase inhibitor, RPR101511A. *Circulation*. 1999;99:3292-3299.
171. Kilic T, Alberta J, Zdunek P, Acar M, Iannarelli P, O'Reilly T, Buchdunger E, Black P, Stiles C. Intracranial inhibition of platelet-derived growth factor-mediated glioblastoma cell growth by an

- orally active kinase inhibitor of the 2-phenylaminopyrimidin class. *Cancer Res.* 2000;60:5143-5150.
172. Buchdunger E, Cioffi C, Law N, Stover D, Ohno-Jones S, Ducker B, Lydon N. Abl protein-tyrosin kinase inhibitor STI571 inhibits in vitro signal transduction mediated by c-kit and platelet-derived growth factor receptors. *J Pharmacol Exp Ther.* 2000;295:139-145.
173. Yu J, Lokker N, Hollenbach S, Apatira M, Li J, Betz A, Sedlock D, Oda S, Nomoto Y, Matsuno K, Ide S, Tsukuda E, Giese N. Efficacy of the novel selective platelet-derived growth factor receptor antagonist CT52923 on cellular proliferation, migration, and suppression of neointima following vascular injury. *J Pharmacol Exp Ther.* 2001;298:1172-1178.
174. Abrams T, Lee L, Murray L, Pryer N, Cherrington J. SU11248 inhibits KIT and platelet-derived growth factor receptor beta in preclinical models of human small lung cancer. *Mol Cancer Ther.* 2003;2:471-478.
175. Gazit A, Lee K, Uecker A, Böhmer F, Sjoblom T, Östman A, Waltenberg S, Golomb G, Banai S, Heinrich M, Levitzki A, Buchdunger E, Black P, Stiles C. Intracranial inhibition of platelet-derived growth factor-mediated glioblastoma cell growth an orally active kinase inhibitor of the 2-phenylaminopyrimidine class. *Cancer Res.* 2000;60:5143-5150.
176. Drucker B, Tamura S, Buchdunger E, Ohno S, Segal G, Fanning S, Zimmermann J, Lydon N. Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nat Med.* 1996;2:561-566.
177. Deininger M, Goldman J, Lydon N, Melo J. The tyrosine kinase inhibitor CGP57148B selectively inhibits the growth of BCR-ABL-positive cells. *Blood.* 1997;90:3691-3698.
178. Krause D, VanEtten R. Tyrosine Kinases as Targets for Cancer Therapy. *N Engl J Med.* 2005;353:172-187.
179. Sheinerman F, Giraud E, Laoui A. High affinity target of protein kinase inhibitors have similar residues at the positions energetically important for binding. *J Mol Biol.* 2005;352:1134-1156.
180. Capdeville R, Buchdunger E, Zimmermann J, Matter A. Glivec (STI571, Imatinib) a rationally developed targeted anticancer drug. *Nature Rev.* 2002;1:493-501.
181. Reckmann A, Fischer T, Peng B, Hayes M, Mehring G, Reese S, Resta D, Ben-Am M, Gschaidmeier H, Huber C, Capdeville R, Gutenberg J. Effect of food on STI571 Glivec pharmacokinetics and bioavailability. *ASCO.* 2001:1223.
182. Drucker B, Sawyers C, Kantarjian H, Resta D, Fernandez-Reese S, Ford J, Capdeville R, Talpaz M. Activity of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosin-kinase in the blast crisis of chronic myeloid leukemia in acute lymphoblastic leukemia with the Philadelphia chromosome. *N Engl J Med.* 2001;344.
183. Drucker B, Talpaz M, Resta D, Peng B, Buchdunger E, Ford J, Lydon N, Kantarjian H, Capdeville R, Ohno-Jones S, Sawyers C. Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosin-kinase in chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 2001;344:1031-1037.
184. Peng B, Lloyd P, Schran H. Clinical Pharmacokinetics of Imatinib. *Clin Pharmacokinet.* 2005;44:879-894.
185. Hochhaus A, Lahaye T, Kreil A, Berger U, Metzgeroth G, Hehlmann R. Selektive Hemmung von Tyrosinkinase als neues therapeutisches Prinzip in der Onkologie. *Onkologie.* 2001;24:65-71.
186. Miettinen M, Lasota J. Gastrointestinal stromal tumors-definition, clinical, histological, immunohistochemical, and molecular genetic features and differential diagnosis. *Virchows Arch.* 2001;438:1-12.

187. Dror Y, Leaker M, Caruana G, Berstein A, Freedman M. Mastocytosis cells bearing a c-kit activating point mutation are characterized by hypersensitivity to stem cell factor and increases apoptosis. *Br J Haematol*. 2000;108:729-736.
188. Li J, Kleeff J, Guo J, Fischer L, Giese N, Büchler M, Fires H. Effects of STI571 (gleevec) on pancreatic cancer cell growth. *Molecular Cancer*. 2003;2:32-41.
189. Hwang R, Yokoi K, Bucana C, Tsan R, Kikkion J, Evans D, Fidler I. Inhibition of platelet-derived growth factor receptor phosphorylation by STI571 (Gleevec) reduce growth and metastasis of human pancreatic carcinoma in an orthotopic nude mouse model. *Clin Canc Res*. 2003;9:6534-6544.
190. Deininger M, Goldman J, Melo J. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2000;96:3343-3356.
191. Mauro M, Drucker B. STI571: Targeting bcr-abl as therapy for CML. *The Oncologist*. 2001;6:233-238.
192. Abdollahi A, Li M, Ping G, Plathow C, Domhan S, Kiessling F, Lee L, McMahon G, Gröne H, Lipson K, Huber P. Inhibition of platelet-derived growth factor signaling attenuates pulmonary fibrosis. *JEM*. 2005;201:925-935.
193. Tsai Y, Lee R, Lin S, Chen Y. Identification of a novel platelet-derived growth factor-like gene, fallotein, in the human reproductive tract. *Biochim Biophys Acta*. 2000;1492:196-202.
194. Böck P. In Romeis B, Hrsg. *Romeis Mikroskopische Technik. 17te neubearbeitete Aufl. München, Wien, Baltimore: Urban&Schwarzenberg*. 1989.
195. Reed L, Muench H. A simple method of estimating fifty per cent endpoint. *Am J Hyg*. 1938;27:p493.
196. Platzer C, Richter G, Uberla K, Müller W, Blocker H, Diamantstein T, Blankenstein T. Analysis of cytokine mRNA levels in interleukin-4-transgenic mice by quantitative polymerase chain reaction. *Eur J Immunol*. 1992;22:1179-1184.
197. Diikman H, Mentzel S, de Jong A, Assmann K. RNA in situ hybridization using digoxigenin-labeled cRNA probes. *Biochemica*. 1995;2:23-27.
198. Koehler W, Schachtel G, Voleske P. *Biostatistik 2 ed. Berlin: Springer Verlag*. 1992.
199. Krah A. Die Entwicklung von Immunoproteomics-Methoden am Beispiel der Identifizierung Magenkarzinom-assoziiierter *Helicobacter pylori* Antigene. *Dissertation*. 2004.
200. Tamura A, Kusachi S, Nogami K. Tenascin expression in endomyocardial biopsy specimens in patients with dilated cardiomyopathy: distribution along margin of fibrotic lesions. *Heart*. 1996;75:291-294.
201. Eismann U, Sommer M, Kosmehl H, Appenroth D, Fleck C, Stein G. Fibronectin splice variants-prognostic markers for the stage of renal interstitial fibrosis in the rat. *Nephron*. 2002;92:379-388.
202. Mena I, Perry C, Harkins S, Rodriguez F, Gebhard J, Whitton J. The role of B lymphocytes in coxsackievirus B3 infection. *Am J Pathol*. 1999;155:1205-1215.
203. Klingel K, Stephan S, Sauter M, Zell R, McManus B, Bultmann B, Kandolf R. Pathogenesis of murine enterovirus myocarditis: virus dissemination and immune cell targets. *J Virol*. 1996;70:8888-8895.
204. Cunningham L, Bowles N, Lane R, Dubowitz V, Archard L. Persistence of enteroviral RNA in chronic fatigue syndrome is associated with the abnormal production of equal amounts of positive and negative strands of enteroviral RNA. *J Gen Virol*. 1990;71:1399-1402.

205. Geller T, Condie D. A case of protracted coxsackie virus meningoencephalitis in a marginally immunodeficient child treated successfully with intravenous immunoglobulin. *J Neurol Sci.* 1995;129:131-133.
206. Figulla H, Siegener M, Mall G, Heim A, Kreuzer H. Myocardial enterovirus infection with left ventricular dysfunction: a begin disease compare with idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol.* 1995;25:1170-1175.
207. Lotze U, Busch J, Glück B, Sigusch H, Kühnert H, Dannberg G, Stelzner A. Erniedrigte Apoptoserate bei Enterovirus-assoziiertes dilatativer Kardiomyopathie. *Z Kardiol.* 1998;87:159.
208. Why H, Meany B, Richardson P, Olsen E, Bowles N, Cunningham L, Freek C, Archard L. Clinical and prognostic significance of detection of enteroviral RNA in the myocardium of patients with myocarditis or dilated cardiomyopathy. *Circulation.* 1994;89:2582-2589.
209. Pauschinger M, Chandrasekharan K, Noutsias M, Kühl U, Schwimmbeck P, Schultheiss H. Viral heart disease: molecular diagnosis, clinical prognosis, and treatment strategies. *Med Microbiol Immunol (Berl).* 2004;193:65-69.
210. Pevear D, Tull T, Seipel M, Groake J. Activity of pleconaril against enteroviruses. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999;43:2109-2115.
211. Rotbart H, Webster A. Treatment of potentially life-threatening enterovirus infections with pleconaril. *Clin Infect Dis.* 2001;32:228-235.
212. Kühl U, Pauschinger M, Schwimmbeck P, Seeberg B, Lober C, Noutsias M, Poller W, Schultheiss H. Interferon-beta treatment eliminates cardiotropic viruses and improves left ventricular function in patients with myocardial persistence of viral genomes and left ventricular dysfunction. *Circulation.* 2003;107:2793-2798.
213. Martinet Y, Menard O, Vaillant P, Vignaud J, Marinnet N. Cytokines in human lung fibrosis. *Archives Toxicol.* 1996;Suppl. 18:127-139.
214. Lane J, Neumann D, Lafond-Walker A, Herskowitz A, Rose N. Interleukin 1 or tumor necrosis factor can promote Coxsackie B3-induced myocarditis in resistant B10.A mice. *J Exp Med.* 1992;175:1123-9.
215. Huber S, Polgar J, Schultheiss P, Schwimmbeck P. Augmentation of pathogenesis of coxsackievirus B3 infection in mice by exogenous administration of interleukin-1 and interleukin-2. *J Virol.* 1994;68:195-206.
216. Matsumori A, Yamada T, Suzuki H, Matoba Y, Sasayama S. Increased circulating cytokines in patients with myocarditis and cardiomyopathy. *Br Heart J.* 1994;66:356-358.
217. Sigusch H, Lehmann M, Reinhardt D, Glück B, Figulla H. Expression von Tumornekrosefaktor-alpha (TNF-alpha) in der Endomyokardbiopsie korreliert mit dem Ausmaß der Entzündung. *Zeitschrift für Kardiologie.* 1999;88:204.
218. Kanda T, Takahashi T. Interleukin-6 and cardiovascular diseases. *Jpn Heart J.* 2004;45:183-193.
219. Seko Y, Takahasi N, Yagia H, Okumura K, Yazaki Y. Expression of cytokin mRNA in murine heart acute myocarditis caused by Coxsackievirus B3. *J Pathol.* 1997;183:105-108.
220. Okuno M, Nakagawa M, Shimada M, Saito M, Hishinuma S, Yamauchi-Takahara K. Expressional patterns of cytokines in a murine model of acute myocarditis: early expression of cardiotrophin-1. *Lab Invest.* 2000;80:433-440.
221. Wessely R, Klingel K, Knowlton K, Kandolf R. Cardiospecific infection with coxsackievirus B3 requires intact type I interferon signaling: implications for mortality and early viral replication. *Circulation.* 2001;103:756-761.

222. Heim A, Weiss S. Interferons in enteroviral heart disease: modulation of cytokine expression and antiviral activity. *Med Microbiol Immunol (Berl)*. 2004;193:149-145.
223. Heim A, Canu A, Kirschner P. Synergistic interaction of interferon-beta and interferon-gamma in coxsackievirus B3-infected carrier cultures of human myocardial fibroblast. *J Infect Dis*. 1992;166:958-965.
224. Fairweather D, Frisancho-Kiss S, Yusung S, Barrett M, Davis S, Gatewood S, Njoku D, Rose N. Interferon-gamma protects against chronic viral myocarditis by reducing mast cell degranulation, fibrosis, and the profibrotic cytokines transforming growth factor-beta, interleukin-1beta, and interleukin-4 in the heart. *Am J Pathol*. 2004;165:1883-1894.
225. Zell R, Markraf R, Schmidtke M, Görlach M, Stelzner A, Henke A, Sigusch H, Glück B. Nitric oxide donors inhibits the coxsackievirus B3 proteinases 2A and 3C in vitro, virus production in cells, and signs of myocarditis in virus-infected mice. *Med Microbiol Immunol (Berl)*. 2004;193:91-100.
226. Yamada T, Matsumori A, Sasayama S. Therapeutic effects of anti-tumor necrosis factor-alpha antibody on the murine model of viral induced encephalomyocarditis virus. *Circulation*. 1994;89:846-851.
227. Freitag D. Der Einfluss von Tumornekrosefaktor-alpha auf die Pathogenese der Coxsackievirus B3-induzierten Myokarditis. 2005.
228. Satoh M, Nakamura M, Tamura G, Makita S, Segawa I, Tashiro A, Satodate R, Hiramori K. Inducible nitric oxide synthase and tumor necrosis factor-alpha in myocardium in human dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*. 1997;29:716-724.
229. Deswal A, Petersen N, Feldmann A, Young J, White B, Mann D. Cytokines and cytokine receptors in advanced heart failure: an analysis of the cytokine database from the Vesnarinone trial (VEST). *Circulation*. 2001;103:2055-2059.
230. Rosenkranz S, Flesch M, Amann K, Häusler C, Kilter H, Seeland U, Schulter K, Böhm M. Alterations of beta-adrenergic signaling and cardiac hypertrophy in transgenic mice overexpressing TGF-beta (1). *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002;283:1253-1262.
231. Kishimoto C, Kitazawa M, Takada H. Interstitial fibrin-fibronectin deposition with T cell infiltrates precedes fibrosis in murine viral myocarditis. *Int J Exp Pathol*. 1998;79:417-423.
232. Schneider I. Der Einfluss einer CD40-Defizienz auf den Krankheitsverlauf der CVB3-induzierten Myokarditis. 2004.
233. Grazul-Bilska A, Johnson M, Bilski J, Redmer D, Reynolds L, Abdullah A, Abdullah K. Wound healing: the role of growth factors. *Drugs Today*. 2003;39:787-800.
234. Jinnin M, Ihn H, Mimura Y, Asano Y, Yamane K, Tamaki K. Regulation of fibrogenic/fibrolytic genes by platelet-derived growth factor C, a novel growth factor, in human dermal fibroblast. *J Cell Physiol*. 2003;202:510-517.
235. Uutela M, Wirzenius M, Paavonen K, Rajantie I, He Y, Karpanen T, Lohela M, Wiig H, Salven P, Pajusola K, Eriksson U, Alitalo K. PDGF-D induces macrophage recruitment, increased interstitial pressure, and blood vessel maturation during angiogenesis. *Blood*. 2004;104:3198-3204.
236. Heldin C, Eriksson U, Östman A. New members of platelet-derived growth factor family of mitogens. *Arch Biochem Biophys*. 2002;398:284-290.
237. Kumagai S, Ohtani H, Nagai T, Funa K, Hiwatashi N, Shimosegawa, Nagura H. Platelet-derived growth factor and its receptors are expressed in areas of both active inflammation and active fibrosis in inflammatory bowel disease. *Tohoku J Exp Med*. 2001;195:21-33.

238. Krettek A, Östergren-Lunden G, Fager G, Rosmond C, Bonjers G, Lustig F. Expression of PDGF receptors and ligand-induced migration of partially differentiated human monocyte-derived macrophages. Influence of INF-gamma and TGF-beta. *Atherosclerosis*. 2001;156:267-275.
239. Powell D, Mifflin R, Valentich J, Crowe S, Saada J, West A. Myofibroblast, I: paracrine cells important in health and disease. *Am J Physiol*. 1999;277:C1-C19.
240. Siwik D, Chang D, Colucci W. Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha decrease collagen synthesis and increase matrix metalloproteinase activity in cardiac fibroblast in vitro. *Circ Res*. 2000;86:1259-1265.
241. Eitner F, Ostendorf T, VanRoeyen C, Kitahara M, Li X, Aase F, Gröne H, Eriksson U, Flöge J. Expression of a Novel PDGF Isoform, PDGF-C, in Normal and Diseased Rat Kidney. *J Am Soc Nephrol*. 2002;13:910-917.
242. Böhmer F, Karagyozov L, Uecker A, Serve H, Botzki A, Mahboobi S, Dove S. A single amino acid exchange inverts susceptibility of related receptor tyrosine kinase for the ATP site inhibitor STI-571. *JBC*. 2003;278:5148-5155.
243. Yoshiji H, Noguchi R, Kuriyama S, Ikenaka Y, Yoshii J, Yanase K, Namisaki T, Kitade M, Masaki T, Fukui H. Imatinib mesylate (STI-571) attenuates liver fibrosis development in rats. *Am J Physiol Gastro Liver Physiol*. 2005;288:907-913.
244. Jandt E, Denner K, Kovalenko M, Östman A, Böhmer F. The protein-tyrosine phosphatase DEP-1 modulates growth factor-stimulated cell migration and cell-matrix adhesion. *Oncogene*. 2003;22:4175-4185.
245. Lee J, Zaidi S, Dawood F, Cheah A, Wen W, Saiki Y, Rabinovitch M. A serin elastase inhibitor reduced inflammation and fibrosis and preserves cardiac function after experimentally-induced murine myocarditis. *Nature Medicine*. 1998;4:1383-1391.
246. Kinnman N, Francoz C, Barbu V, Wendum D, Rey C, Hultcrantz R, Poupon R, Housset C. The myofibroblastic conversion of peribiliary fibrogenic cells distinct from hepatic stellate cells is stimulated by platelet-derived growth factor during liver fibrogenesis. *Lab Invest*. 2003;83:163-173.
247. Schelling M, Baumann M, van Leeuwen R, Duisters R, Janssen S, Schroen B, Peutz-Kootstra C, Heymans S, Pinto Y. Imatinib attenuates end-organ damage in hypertensive homozygous TGR8mRen2)27 rats. *Hypertension*. 2006;47:467-474.
248. Opavsky M, Martino T, Rabinovitch M, Penninger J, Richardson C, Petric M, Trinidad C, Butcher L, Chan J, Liu P. Enhanced ERK-1/2 activation in mice susceptible to coxsackievirus-induced myocarditis. *J Clin Invest*. 2002;109:1561-1569.
249. Ishida Y, Takayasu T, Kimura AH, T., Kakimoto N, Miyashita T, Kondo T. Gene expression of cytokines and growth factors in the lung after paraquat administration in mice. *Legal Medicine*. 2005:1-8.
250. Beham-Schmid C, Apfelbeck U, Sill H, Tsybrovsky O, Hofler G, Haas O, Linkesch W. Treatment of chronic myelogenous leukemia with the tyrosin kinase inhibitor STI571 results in marked regression of bone marrow fibrosis. *Blood*. 2002;99:381-383.
251. Fujita M, Shannon J, Morikawa O, Gaudie J, Hara N, Mason R. Overexpression of tumor necrosis factor-alpha diminishes pulmonary fibrosis induced by bleomycin or transforming growth factor-beta. *Am J Resp Cell&Mol Biol*. 2003;29:669-676.
252. Pauschinger M, Knopf D, Petschauer S, Doerner A, Poller W, Schwimmbeck P, Kühl U, Schultheiss H. Dilated cardiomyopathy is associated with significant changes in collagen type I/III ratio. *Circulation*. 1999;99:2750-2756.

-
253. Cheng J. Expression of TGF-beta 1 and proliferation of collagen in myocardium in viral myokarditis. *Fa Yi Xue Za Zhi*. 2000;16.
254. Müller A, Stein G, Lehmann G, Hein G. Investigation of bone turnover in renal osteopathy. *Eur J Med Res*. 1999;4:78-84.
255. Pohlers D, Huber R, Ukena B, Kinne R. Expression of platelet-derived growth factor C and D in the synovial membrane of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Arthritis & Rheumatism*. 2006;54:788-794.
256. Montgomery R, Dallmann M. Analysis of cytokine gene expression during fetal thymic ontogeny using the polymerase chain reaction. *J Immunol*. 1991;147:554-560.
257. Kita M, Liu Y, Imanishi J. Role of cytokine in murine model of myocarditis induced by encephalomyocarditis virus. *Eur Cytokine Netw*. 1996;7:449.
258. Matsumoto K, Hiraiwa N, Yoshiki A, Ohnishi M, Kusakabe M. PDGF receptor-alpha deficiency in glomerular mesangial cells of tenascin-C knockout mice. *Biochem Biophys Res Communications*. 2002;290:1220-1227.
259. Dewar AL, Cambareri AC, Zannettino ACW, Miller BL, Doherty KV, Hughes TP, Lyons AB. Macrophages colony-stimulating factor receptor c-fms is a novel target of Imatinib. *Blood*. 2005; 105:3127-3132.
260. Taylor JR, Brownlow N, Domin J, Dibb NJ. FMS receptor for M-CSF (CSF-1) is sensitive to the kinase inhibitor Imatinib and mutation of Asp-802 to Val confers resistance. *Oncogene*. 2005; 25:147-151.

Anhang

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildungen
Ak	Antikörper
Akt/PKB	Proteinkinase B
ALL	akute lymphatische Leukämie
APC	Antigen-präsentierende Zelle (antigene presenting cells)
Arg	Abelson-ähnliches Gen (Abelson related gene)
Aqua dest.	Destilliertes Wasser (deionisiert und autoklaviert)
AS	Aminosäure(n)
AS`	antisense Richtung
ATCC	American Tissue Culture Collection
ATP	Adenosintriphosphat
Bcr-Abl	Philadelphia-Chromosom-Translokation
BG	Bindegewebe
BMP-1	Knochenmorphogenetische Proteine
Bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
CAR	Coxsackie-Adenovirus Rezeptor
c-Abl	c-Abelson; Oncogen
cDNA	komplementäre DNA (complementary DNA)
c-Kit/SCFR	Stammzellfaktor Rezeptor
CML	chronisch myeloische Leukämie
CVB3	Coxsackievirus B3
CVB3-Mü/J	Coxsackievirus B3-Variante München/Jena
d	Tag
DAF	Oberflächenprotein CD55 (decay accerlerating factor)
DCM	Dilatative Kardiomyopathie
d. h.	das heißt
DIG	Digoxigenin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure (desoxyribunucleinic acid)
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor (epidermal growth factor)
ECM	extrazelluläre Matrix
ERK1/2	extrazelluläre Signalregulierende Kinase
F	Fibrose
FDA	Food and Drug Administration
FGF	Fibroblasten Wachstumsfaktor

Flt3	FMS-ähnliche Tyrosinkinase III (FMS-like tyrosine kinase III)
g	Gramm
GF	Granulationsgewebe
GIST	gastrointestinale Stromatumore
H	Herz
h	Stunde
H-2	Histokompatibilitätsantigen der Maus
HE	Färbung mit Hämatoxylin/Eosin
HIV	Humanes Immundefizientes Virus (human immunodeficiency virus)
HSPG	sulfatierte Heparansulfat-Proteoglykane
HRP	Meerrettich Peroxidase (horseradish peroxidase)
I	Infiltrat
I.E.	internationale Einheiten
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
Ig-ähnliche Domäne	Immunglobulin-ähnliche Domäne
IGF(1)	Insulin-ähnlicher Faktor-1 (Insulin-like growth factor 1)
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
i. p.	intraperitoneal
IP ₃	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
ISH	In Situ-Hybridisierung
IVC	einzelbelüftete Käfige
kb	kiloBasen, 1000 Basenpaare
kDa	kiloDalton
ko	knockout
KT	Kontrolltiere
Lsg.	Lösung
m	Milli
M	Molar
MCSF-1R	Makrophagen-Kolonie-Stimulations Faktor 1-Rezeptor
MEM/E	Minimum Essential Medium (von Harry Eagle)
MHC	Major Histokompatibility Complex
min	Minute
mind.	mindestens

mRNA	Boten RNA (messenger RNA)
MSC	multiple cloning site
MW	Molekulargewicht
NG	Nachweisgrenze
nm	Nanometer
NP-1	Neutrophile Proteine
o. g.	oben genannte
OD	optische Dichte
p. i.	post infectionem
PAA-Gel	Poly-Acryl-Amid-Gel
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDGF	von Blutplättchen stammender Wachstumsfaktor (platelet-derived growth factor)
PDGFR	PDGF-Rezeptor
pfu	Plaque-bildende Einheiten (plaque-forming units)
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RTK's	Transmembran-Tyrosinkinase-Rezeptor
RT-PCR	reverse Transkriptase-PCR
s	Sekunde
S'	sense Richtung
Ser	Serin
s. o.	siehe oben
SPF	spezifisch Pathogenfrei
SR	Färbung mit Sirius-Rot
STI	intrazelluläre Signaltransduktion
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA
TCID ₅₀	Tissue culture infection dose ₅₀
TGF	transformierender Wachstumsfaktor (transforming growth factor)
Thr	Threonin
TH-Zelle	T-Helfer-Zelle
TNF	Tumornekrosefaktor (tumor necrosis factor)
Tyr	Tyrosin

U	Einheiten (units)
u. a.	unter anderem
ü. N.	über Nacht
V	Virus
VP1-VP4	virales Protein 1-4
Vergrößerung x100/ x200/ x400	100-, 200- oder 400-fache Vergrößerung
VP	Viruskapsidprotein
w/v	weight per volume
z. B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem
β-Aktin	beta-Aktin
μ	Mikro
3D ^{pol}	3D-Polymerase

Bilder- und Tabellenanhang

Tab. 7: Verwendete Oligonukleotid-Primer

Molekül	Proben mRNA (bp)	Kontroll-Fragment (bp)	Zyklen	Primer-Sequenzen Bindungstemperatur
pMCQ β-Aktin ¹⁹⁶	348	264	35	60°C Bindungstemperatur S ⁻ -TGG AAT CCT GTG GCA TCC ATG AAA C AS ⁻ -TAA AAC GCA GCT CAG TAA CAG TCC G

Molekül	Proben mRNA (bp)	Zyklen	Primer-Sequenzen Bindungstemperatur
β-Aktin ²⁵⁶	590	30	56,0°C Bindungstemperatur S ⁻ -ATG GAT GAC GAT ATC GCT AS ⁻ -ATG AGG TAG TCT GTC AGG T
VP1 (PD Dr. A. Henke, Institut für Virologie und Antivirale Therapie, Jena)	851	30	56,0°C Bindungstemperatur S ⁻ -GGC CCA GTG GAA GAC GCG AS ⁻ -AAA TGC GCC CGT ATT TGT CAT TG
PDGF-A	226	30	60,0°C Bindungstemperatur S ⁻ -GCC TGT GCC CAT TCG CAG GAA GA AS ⁻ -GGC CAC CTT GAC ACT GCG GTG G
PDGF-B	538	28	59,1°C Bindungstemperatur S ⁻ -TCT TCC TTC CTC TCT GCT GCT ACC AS ⁻ -GGG GTC ACT ATT GTC TCA CAC TTG C
PDGF-C ¹⁹³	395	30	56,1°C Bindungstemperatur S ⁻ -TGG ACA GCC TCT ACA AGC CAA C AS ⁻ -TGC GTT TCC TCT ACA CAC ACA GTC
TNF-α Clontec, Palo-Alto, USA	354	30	60,0°C Bindungstemperatur S ⁻ -TTC TGT CTA CTG AAC TTC GGG GTG ATC GGT CC AS ⁻ -GTA TGA GAT AGC AAA TCG GCT GAC GGT GTG GG
IFN-β Clontec, Palo-Alto, USA	509	30	60,0°C Bindungstemperatur S ⁻ -CAG CTC CAG CTC CAA GAA AGG ACG AAC ATT CG AS ⁻ -CCA CCA CTC ATT CTC ATT CTG AGG CAT CAA CTG ACA GG
IFN-γ Clontec, Palo-Alto, USA	365	30	60,0°C Bindungstemperatur S ⁻ -TGC ATC TTG GCT TTG CAG CTC TTC CTC ATG GC AS ⁻ -TGG ACC TGT GGG TTG TTG ACC TCA AAC TTG GC
IL-1α Clontec, Palo-Alto, USA	491	30	60,0°C Bindungstemperatur S ⁻ -AAG ATG TCC AAC TTC ACC TTG AAG GAG AGC CG AS ⁻ -AGG TCG GTC TCA CTA CCT GTG ATG AGT TTT GG
IL-1β Clontec, Palo-Alto, USA	363	35	60,0°C Bindungstemperatur S ⁻ -ATG GCA ACT GTT CCT GAA CTC AAC T AS ⁻ -CA GGA CAG GTA TAG ATT CTT TCC TTT

IL-2 Clontec, Palo-Alto, USA	413	30	60,0°C Bindungstemperatur S'-TTC AAG CTC CAC TTC AAG CTC TAC AGC GGA AG AS'-GAC AGAAGGCTA TCC ATC TCC TCA GAA AGT CC
IL-6 Clontec, Palo-Alto, USA	638	33	60,0°C Bindungstemperatur S'-ATG AAG TTC CTC TCT GCA AGA GAC T AS'-CAC TAG GTT TGC CGA GTA GAT CTC
IL-10 Clontec, Palo-Alto, USA	455	30	60,0°C Bindungstemperatur S'-ATG CAG GAC TTT AAG GGT TAC TTG GGT T AS'-ATT TCG GAG AGA GGT ACA AAC GAG GTT T
IL-12 _{p40} ²⁵⁷	365	30	Bindungstemperatur S'-GAG GTG GAC TGG ACT CCC GA AS'-CAA GTT CTT GGG CGG GTC TG
Tenascin-C ²⁵⁸	447	27	60,0°C Bindungstemperatur S'-GCA AGC TGA TCC AAA CCA TCT TCA CAA C AS'-AGT CAC CTG CTG TTC CAC TGT ATC C
Fibronectin-Fn ²⁰¹	531	29	60,0°C Bindungstemperatur S'-GCC ATC ACG CCG AGC ATT CT AS'-CAT TTT TGG GAG CGG TGG TCA

Molekül	Proben mRNA (bp)	Zyklen	Primer-Sequenzen Bindungstemperatur
PDGF-C Sonde ¹⁹³	625	35	56,5°C Bindungstemperatur S'-TCC AGC GAC AAG GAA CAG AAC G AS'-GGA GAT TCA GAT TCA CCA CTT TGC

Tab. 8: Reagenzien für die RT-PCR

PCR-Fragment	5 µM Primer (2x 1 µl sense + antisense Primer)	Aqua dest. [µl]	10x PCR-Synthese Puffer [µl]	1,25 mM dNTP [µl]	MgCl ₂ mM	Solution Q [µl]	Taq-Polymerase [µl]
β-Aktin	2,0	20,75	5,0	8,0	2,5	10,0	0,25
VP1	2,0	22,75	5,0	8,0	1,5	10,0	0,25
PDGF-C	2,0	30,75	5,0	8,0	2,5	----	0,25
PDGF-B	2,0	20,75	5,0	8,0	2,5	10,0	0,25
PDGF-A	2,0	20,75	5,0	8,0	2,5	10,0	0,25
IFN-β	2,0	30,75	5,0	8,0	2,5	----	0,25
IFN-γ	2,0	30,75	5,0	8,0	2,5	----	0,25
TNF-α	2,0	20,75	5,0	8,0	2,5	10,0	0,25
IL-1α	2,0	32,75	5,0	8,0	1,5	----	0,25
IL-1β	2,0	22,75	5,0	8,0	1,5	10,0	0,25
IL-2	2,0	32,75	5,0	8,0	1,5	----	0,25
IL-6	2,0	32,75	5,0	8,0	1,5	----	0,25
IL-10	2,0	32,75	5,0	8,0	1,5	----	0,25
IL-12 _{p40}	2,0	32,75	5,0	8,0	1,5	----	0,25
Tenascin-C	2,0	20,75	5,0	8,0	2,5	10,0	0,25
Fibronectin-Fn	2,0	22,75	5,0	8,0	1,5	10,0	0,25

Tab. 9: PCR-Bedingungen

PCR-Fragment	Denaturierung		Primer-Annealing		Polymerisation		Zyklen
	Temperatur [°C]	Zeit [s]	Temperatur [°C]	Zeit [s]	Temperatur [°C]	Zeit [s]	
β-Aktin	94	60	56	50	72	50	30
VP1	94	60	45	50	72	50	33
PDGF-C	94	45	60	45	72	120	28
PDGF-B	94	60	60	60	72	60	28
PDGF-A	94	60	60	60	72	60	35
IFN-β	94	45	60	45	72	120	30
IFN-γ	94	45	60	45	72	120	33
TNF-α	94	45	60	60	72	120	30
IL-1α	94	45	60	45	72	120	32
IL-1β	94	45	60	45	72	120	30
IL-2	94	45	60	45	72	120	35
IL-6	94	45	60	45	72	120	35
IL-10	94	45	60	45	72	120	30
IL-12 _{p40}	94	45	60	60	72	60	30
Tenascin-C	94	60	60	60	72	60	26
Fibronectin -Fn	94	45	60	45	72	60	30
pMCQ	94	60	60	60	72	60	35

Tab. 10: Histologische Bewertungskriterien für das Myokard

Bewertung	Infiltrat (Hämatoxylin/Eosin-Färbung)	Fibrose (Siriusrot-Färbung)
0	kein Infiltrat	keine Fibrose
1	fokale Entzündungszellen/ bis zu 2 kleine Infiltrate und/oder ein großes Infiltrat pro Ventrikel/ milde Infiltration	sichtbare pathologische Anreicherung von Bindegewebe und/oder sichtbare milde Fibrose an mehr als einer Stelle
2	mehr als ein großes Infiltrat/ mehr als 2 konfluierende oder kleine Infiltrate/ moderate Infiltration	bindegewebiger Umbau ganzer Muskelareale/ moderate Fibrose
3	diffuse und/ oder starke Infiltration der gesamten Ventrikelwand	Fibrose der kompletten Ventrikelwand/ strenge Fibrose

Tab. 11: Antikörper-Verdünnung

Antigen	Primärantikörper	Sekundärantikörper
goat-anti-mPDGF-A (I-20)	1:100	1:500
rabbit-anti-mPDGF-B (H-55)	1:100	1:200
rabbit-anti-mPDGF-C	1:300	1:200
rabbit-anti-mPDGFR-α (951)	1:200	1:200
rabbit-anti-phospho-Akt (Ser473)	1:100	1:200
rabbit-IgG Isotypkontrolle (Sc-2027)	4µg/ml	1:200

Tab. 12: Konzentration des Tyrosinkinase Hemmstoffes STI571 im Myokard von CVB3-infizierten und scheininfizierten MHC Klasse II ko Mäusen, die 2x täglich mit 50 mg/kg bzw. 150 mg/kg STI571 behandelt wurden. Dargestellt ist neben der Behandlungsdauer und der verabreichten STI571 Dosis die Berechnung der vorliegenden STI571-Konzentration im Herzgewebe (ko: knockout).

Herzgewebe von scheininfizierten /CVB3-infizierten Mäusen	Behandlung mit STI571	Tage der Behandlung	Konzentration von STI571 im Herzextrakt; [ng/ml]	Konzentration von STI571 im Herzgewebe; [ng/ml] ($\times 10^{-2}$)	Konzentration von STI571 im Herzgewebe [$\mu\text{Mol/l}$]
scheininfiziert	50 mg/kg	1	11,5	1,29	0,22
scheininfiziert	50 mg/kg	1	39,6	4,45	0,75
scheininfiziert	50 mg/kg	2	94,9	10,67	1,81
scheininfiziert	50 mg/kg	2	66,5	7,48	1,27
scheininfiziert	50 mg/kg	3	44,7	5,02	0,85
scheininfiziert	50 mg/kg	3	48	5,40	0,92
CVB3-infiziert 8. d p. i.	50 mg/kg	1	99,0	2,47	0,42
CVB3-infiziert 8. d p. i.	50 mg/kg	1	99,5	2,48	0,42
CVB3-infiziert 9. d p. i.	50 mg/kg	2	129	3,22	0,55
CVB3-infiziert 9. d p. i.	50 mg/kg	2	90,4	2,26	0,38
CVB3-infiziert 10. d p. i.	50 mg/kg	3	288	7,20	1,22
CVB3-infiziert 10. d p. i.	50 mg/kg	3	535	13,37	2,27
scheininfiziert	150 mg/kg	1	75,3	8,47	1,44
scheininfiziert	150 mg/kg	1	61,5	6,91	1,17
scheininfiziert	150 mg/kg	2	107	12,03	2,04
scheininfiziert	150 mg/kg	2	258	29,00	4,92
scheininfiziert	150 mg/kg	3	824	92,70	15,60
scheininfiziert	150 mg/kg	3	6860	771,75	130,86
CVB3-infiziert 8. d p. i.	150 mg/kg	1	631	15,77	2,67
CVB3-infiziert 8. d p. i.	150 mg/kg	1	693	17,32	2,94
CVB3-infiziert 9. d p. i.	150 mg/kg	2	1850	46,25	9,54
CVB3-infiziert 9. d p. i.	150 mg/kg	2	1320	33,00	5,60
CVB3-infiziert 10. d p. i.	150 mg/kg	3	1810	45,25	7,67

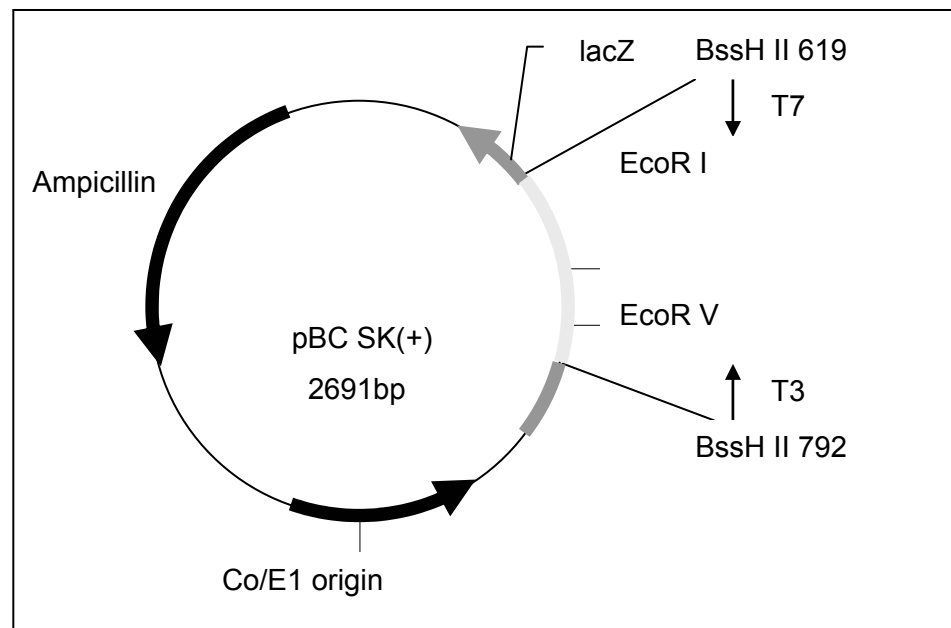


Abb. 22: Schematische Darstellung des pBluescript II KS(+) Plasmides. Das Plasmid ist für die Konstruktion des Kontrollfragmentes der semiquantitativen RT-PCR sowie für die Erstellung der spezifischen RNA-Sonden für die In Situ-Hybridisierung verwendet wurden. Die Sequenz für murines PDGF-C ist aus GenBank, Acc.No. NM 019971.2.

Tab. 13 Körper- und Herzgewicht sowie das Verhältnis des Herz- zum Körpergewicht am Sektionstag (21 d p. i.) von CVB3-infizierten MHC Klasse II ko Mäuse, die entweder mit STI571 oder mit einer Vergleichslösung behandelt wurden, im Vergleich zu scheininfizierten Tieren, die STI571 oder die Vergleichslösung appliziert bekamen. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen. (d: Tag)

Versuchsgruppe	Körpergewicht am Sektionstag (21. d p. i.) [g]	Herzgewicht am Sektionstag (21 d p. i.) [g]	Verhältnis Herzgewicht zum Körpergewicht
Scheininfektion + Aqua dest.; n=15	25,69 ± 2,72	0,11 ± 0,01	4,32
Scheininfektion + STI571; n=29	24,61 ± 3,04	0,11 ± 0,02	4,47
CVB3 + STI; n=35	23,48 ± 1,61	0,11 ± 0,01	4,53
CVB3 + Aqua dest.; n=21	23,74 ± 2,67	0,11 ± 0,01	4,76

Danksagung

An dieser Stelle, möchte ich mich bei vielen wissenschaftlichen Ratgebern für die vielen großen und kleinen Dinge, ohne die diese Arbeit nie zustande gekommen wäre, bedanken.

An erster Stelle und ganz besonderes danke ich Dr. Carola Leipner und Prof. Dr. Frank Böhmer, nicht nur für das Thema der Arbeit und für die zahlreichen anregenden Diskussionen bei der Planung, Durchführung und Interpretation der Experimente, sondern auch für ihre ausdauernde, optimistische und freundliche Betreuung meiner Doktorarbeit.

Des Weiteren möchte ich Prof. Dr. A. Stelzner, Leiter des Institutes für Virologie und Prof. Dr. P. Wutzler, Leiter des Institutes für Virologie und Antivirale Therapie für die Möglichkeit in Ihren Einrichtungen zu promovieren und die mir gewährte Forschungsfreiheit danken.

Allen Mitarbeitern des Institutes für Virologie und Antivirale Therapie, besonders PD. Dr. Andreas Henke, Dr. Eckhard Birsch-Hirschfeld sowie den Mitarbeitern des Institutes für Molekulare Zellbiologie, besonders Dr. Boyka Markova und Andrea Uecker gilt mein Dank für die vielen Gespräche, die angenehme Atmosphäre und die Freude bei der Arbeit.

Besondere Anerkennung verdienen auch Dr. Ilka Schneider, Dipl.-Biol. Diana Freitag, Frau Heike Urban und Frau Veronika Güntzschel, die mich bei der alltäglichen Laborarbeit unterstützt und durch ihre vielen praktischen Tipps zum Gelingen der Laborversuche wesentlich beigetragen haben. Bei den Assistentinnen des Infektionstierhauses, Frau Birgit Schikowski und Frau Birgit Meißner bedanke ich mich für die Aufzucht der Mäuse und die intensive Betreuung bei den Tierversuchen.

Bei PD. Dr. Alexander Berndt (Institut für Pathologie, AG Extrazelluläre Matrix, Universitätsklinikum Jena) bedanke ich mich für die Unterstützung bei der quantitativen Auswertung der histologischen Präparate.

Den Mitarbeitern des Institutes für Versuchstierkunde des Universitätsklinikums der Friedrich-Schiller-Universität unter der Leitung von Herrn Dr. H. Schubert danke ich für die Aufzucht und intensive Betreuung der verwendeten Mäusestämme.

Für die finanzielle Unterstützung während der Erstellung der Arbeit danke ich der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG; BO 1043/5-1) und der Pharmagruppe NOVARTIS Pharma AG Basel.

Bei all meinen Freunden möchte ich mich bedanken, die auf ganz besondere Art und Weise zur Vollendung der Arbeit beigetragen haben.

Schließlich gilt meinen Eltern ganz besonderer Dank, nicht nur für ihre vielfältige und moralische Unterstützung, durch die meine lange Ausbildung erst möglich werden konnte, sondern auch für ihre Liebe, Kraft und Zuversicht.

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich,
dass mir die Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena bekannt ist,

dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe.

dass ich weder die Hilfe eines Promotionsberaters in Anspruch genommen habe noch das Dritte unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorliegenden Dissertationen stehen, von mir erhalten haben,

dass ich mich mit der vorliegenden Arbeit an keiner anderen Hochschule um den akademischen Grad *Doctor rerum naturalium* beworben habe und dass ich weder früher noch gegenwärtig die Eröffnung eines Verfahrens zum Erwerb des oben genannten akademischen Grades an einer anderen Hochschule beantragt habe.

Jena, d. 06. Juli 2006

Katja Grün